



**HEMOGLOBINOPATIAS: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E SUA
IMPORTÂNCIA**

Laura Inês da Cruz Lavouras

**Monografia orientada pela Professora Dr.^a Isabel Cristina Gomes Falcão
Bettencourt Moreira da Silva**

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

LISBOA, 2015

- **2,3-DPG** - 2,3-difosfoglicerato
- **A** – Adenina
- **Δ ALA** – Ácido Delta-aminolevulínico
- **ARMS** - Sistema de Amplificação Refractária de Mutações (*Amplification Refractory Mutation System*)
- **DesoxiHb** – Hemoglobina desoxigenada
- **DGGE** – Electroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)
- **DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- **DPS** - Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis
- **ELISA** – *Enzyme- Linked Immunosorbent Assay*
- **G** - Guanina
- **Hb** – Hemoglobina
- **Hb F** – Hemoglobina Fetal
- **HBA** – Gene da α -globina
- **HBB** – Gene da β -globina
- **HGM** – Hemoglobina Globular Média
- **HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)
- **HVR** – Região Hipervariável (*Hypervariable Region*)
- **IEF** – Focagem isoelétrica (*Isoelectric Focusing*)
- **INSA** – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
- **kb** – Kilo bases
- **LCR** – Região de controlo de locus (*Locus Control Region*)
- **MS-PCR** – *Mutagenically Separated Polymerase Chain Reaction*
- **pb** – Pares de bases
- **PCR** – Reacção de Polimerização em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)
- **PHHF** – Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal
- **OMS** – Organização Mundial de Saúde
- **OxiHb** - Hemoglobina Oxigenada

- **RFLP** – Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)
- **UFC**- Unidades Formadoras de Colônias
- **VGM** – Volume Gobular Médio

As hemoglobinopatias constituem as doenças monogénicas recessivas, mais frequentes a nível mundial. Resultam de alterações nos genes que controlam a síntese directa das cadeias de globina da hemoglobina. Podem subdividir-se em duas categorias, hemoglobinopatias quantitativas, se se verifica uma alteração quantitativa na síntese de um tipo de cadeias globínicas (síndromes talassémicas e persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF)) e hemoglobinopatias qualitativas ou estruturais, se há uma modificação estrutural de um tipo de cadeias globínicas (falciformação dos eritrócitos, anemia hemolítica, policitémia ou, mais raramente, cianose).

Em indivíduos normais, a síntese da α e da β -globina é regulada por quatro genes localizados nos cromossomas 16 e dois nos cromossomas 11.

Estima-se que existam cerca de 270 milhões de portadores de hemoglobinopatias e cerca de 300-500 mil casos de nascimentos de crianças com anemia falciforme e formas severas de talassemia.

Em Portugal, as formas mais graves de hemoglobinopatias são a drepanocitose, a β -talassemia *major* e a β -talassemia intermédia. Neste âmbito, foi criado um Programa Nacional de Controlo de Hemoglobinopatias, com o objectivo de prevenir, diagnosticar e fornecer tratamento adequado às formas graves da doença.

A detecção de portadores de hemoglobinopatias é feita com base no hemograma e no estudo das hemoglobinas composto pela electroforese das hemoglobinas e pela quantificação da Hb A₂ e Hb Fetal, através de técnicas como a HPLC e a focagem isoelectrica (caracterização de fenótipo). No entanto, a confirmação ou caracterização do genótipo de alguns destes distúrbios só pode ser feita através de técnicas de biologia molecular.

A prevenção destas patologias assenta na detecção de possíveis portadores e respectivos cônjuges, aconselhamento genético a casais de risco e diagnóstico pré-natal.

Haemoglobinopathies constitute the commonest recessive monogenic disorders worldwide. They result from alterations in the gene that direct synthesis of the hemoglobin globin chains. They can be divided in two categories, quantitative haemoglobinopathies, if a quantitative change in the synthesis of a globin chain occurs (thalassemia syndromes and hereditary persistence of fetal hemoglobin) and qualitative haemoglobinopathies, in which there is a structural change in one of the globin chain units (sickling of the red blood cells, hemolytic anemia, polycythemia or more rarely cyanosis).

In normal individuals, the α and β -globin synthesis is regulated by four genes in the chromosomes 16 and two in the chromosomes 11.

There're near 270 million carriers for haemoglobinopathies and about 300-500,000 cases of newborns with sickle cell disease and severe forms of thalassemia. In Portugal the most severe forms of haemoglobinopathies are: sickle cell disease, major β -thalassemia and middle β -thalassemia. It was created a National Program for Haemoglobinopathies Control, with the objective of prevent, diagnose and give health treatment to all severe forms of the disease.

The detection of carriers is made through the complete blood count and the study of the haemoglobinopathies or characterization of the phenotype, by quantification of Hb A₂ and Hb F using HPLC and isoelectric focusing techniques. However, the confirmation or genotype characterization can only be made by molecular biology techniques.

The prevention of these diseases is based on detection of carriers, genetic counseling of couples at risk and prenatal diagnosis.

• Abreviaturas e Simbologia	i
• Resumo.....	iii
• <i>Abstract</i>	iv
• Índice.....	v
• Índice de Figuras.....	vi
• Índice de Tabelas.....	vii
I. Introdução.....	1
II. Hemoglobina.....	3
II.1. Estrutura da Hemoglobina.....	4
II.2. Genes das Globinas.....	6
II.2.1 Agrupamento génico da α -globina.....	7
II.2.2 Agrupamento génico da β -globina.....	7
II.3. Expressão diferencial dos genes para as globinas durante a ontogénese	8
II.3.1 Hemoglobina Embrionária.....	10
II.3.2. Hemoglobina Fetal.....	10
II.3.3. Hemoglobina A e A ₂	11
III. Hemoglobinopatias	13
III.1. Epidemiologia.....	13
III.2. Talassemias ou Hemoglobinopatias Quantitativas.....	16
III.2.1 β -Talassemia.....	18
III.2.1.1 Tipos de β -Talassemia.....	21
III.2.2. α -Talassemia.....	27
III.2.2.1 Tipos de α -Talassemia.....	30
III.3. Hemoglobinopatias Estruturais.....	32
IV. Métodos Laboratoriais para Identificação de Anomalias na Síntese da Hemoglobina.....	38
V. Rastreio e Prevenção de Formas Graves de Hemoglobinopatias.....	49
V.I Tipos de Rastreio.....	50
V.II Aconselhamento Genético.....	53
VI. Casuística.....	55
VII. Conclusões	59
• Agradecimentos.....	61

- **Referências Bibliográficas.....62**
- **Anexos67**

Figura 1: Representação da estrutura do grupo prostético heme.....	4
Figura 2: Estrutura da Hemoglobina.....	4
Figura 3: Estrutura tridimensional da hemoglobina com localização dos segmentos helicoidais e representação da ligação das histidinas e oxigénio ao heme.....	5
Figura 4: Propriedades alostéricas da hemoglobina.....	6
Figura 5: Agrupamento génico da α -globina humana no cromossoma 16.....	7
Figura 6: Agrupamento génico da β -globina humana no cromossoma 11.....	8
Figura 7: Ontogenia das Hemoglobinas - Sucessão das diferentes hemoglobinas.....	9
Figura 8: Distribuição global das hemoglobinopatias.....	14
Figura 9: Distribuição das hemoglobinopatias em Portugal	15
Figura 10: Padrão normal da síntese das hemoglobinas em comparação com α -talassemia, β -talassemia <i>minor</i> e β -talassemia <i>major</i>	17
Figura 11: Exemplo de padrões de hereditariedade para β -talassemia.....	21
Figura 12: Origem do gene da Hb Lepore através de um <i>crossover</i> não-homólogo do DNA durante a meiose.....	26
Figura 13: Distribuição mundial da α -talassemia.....	27
Figura 14: Diagrama representativo das deleções do gene da α -talassemia.....	28
Figura 15: Eritrócitos normais, células falciformes e oclusão vascular.....	34
Figura 16: Distribuição global das Hemoglobinopatias E e S.....	36
Figura 17: Representação das mobilidades relativas de algumas hemoglobinas anormais em acetato de celulose, a pH alcalino.....	42
Figura 18: Representação das mobilidades relativas de algumas hemoglobinas anormais em agar de citrato	43
Figura 19: Diagrama com as mobilidades das várias hemoglobinas numa matriz de focagem isoelectrica.....	44
Figura 20: Diagrama representativo de um HPLC.....	45
Figura 21: Separação de hemoglobinas através do método de HPLC.....	47
Figura 22: Diagrama representativo do protocolo de prevenção das formas graves de hemoglobinopatias em grupos de risco, aprovado pela Direcção Geral de Saúde.....	53
Figura 23: Distribuição da amostra por género.....	56
Figura 24: Distribuição etária dos indivíduos em estudo.....	56
Figura 25: Distribuição das hemoglobinopatias na amostra.....	57

Tabela 1: Hemoglobinas presentes os períodos de vida embrionária, fetal e adulta....	12
Tabela 2: Classificação das Talassemias.....	18
Tabela 3: Mutações que resultam em fenótipos de β -talassemia.....	19
Tabela 4: Tipos de β -talassemia e sua descrição clínica.....	24
Tabela 5: Classificação das α -talassemias com origem em mutações deletônicas.....	29
Tabela 6: Classificação das α -talassemias com origem em mutações não-deletônicas .	30
Tabela 7: Tipos de α -talassemia e sua descrição clínica.....	32
Tabela 8: Variantes estruturais com significado clínico mais comuns.....	33
Tabela 9: Técnicas de análise de DNA para o diagnóstico de hemoglobinopatias.....	48

As hemoglobinopatias constituem o grupo de doenças monogénicas recessivas mais difundido a nível mundial. Têm origem em mutações que afectam directamente os genes associados à síntese das cadeias de globina da hemoglobina, podendo resultar em alterações da sua síntese, onde se incluem as síndromes talassémicas e a PHHF, ou em mudanças estruturais, como nos casos de drepanocitose. (1) Até à data já foram identificadas e caracterizadas mais de mil alterações na síntese das hemoglobinas e/ou na sua estrutura. (2)

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, de Janeiro de 2011, estima-se que cerca de 5% da população mundial seja portadora dos genes responsáveis pelo desenvolvimento de hemoglobinopatias e que, anualmente, nasçam cerca de 300.000 crianças como variantes graves destas patologias. (3)

Regra geral, estas patologias são herdadas como padrões autossómicos recessivos. No entanto, algumas hemoglobinopatias podem derivar da herança de um gene autossómico dominante, que dará origem a doença hemolítica no estado de heterozigotia. Já as patologias associadas a genes autossómicos recessivos, precisam de um estado homozigótico para desenvolver um padrão clínico de doença. (4)

Muitos destes distúrbios podem levar à morte dos seus portadores durante os primeiros anos de vida, caso não recebam o devido tratamento. A associação entre a mortalidade infantil e a doença, só começou a ser possível recentemente, após uma transição epidemiológica derivada de melhorias ao nível da higiene, nutrição e controlo de infecções, que contribuíram para a redução da mortalidade permitindo, assim, que os bebés sobrevivam o tempo suficiente para a elaboração de um diagnóstico e respectivo tratamento. (5)

Pensa-se que a alta prevalência das hemoglobinopatias se deve a uma vantagem selectiva dos seus portadores contra o paludismo. Como consequência desta selecção positiva, estas patologias têm uma alta frequência em áreas geográficas como a bacia Mediterrânica, países tropicais como a África subsariana, Médio Oriente, Índia, Sudoeste Asiático e Indonésia, ou seja, países onde a malária ainda é endémica. (6)

Devido à sua alta frequência, diferentes defeitos das hemoglobinas podem ser co-herdados, dando origem a uma série de genótipos complexos e fenótipos clínicos. Em várias regiões, os defeitos talassémicos podem mesmo coexistir com as variantes estruturais das hemoglobinas, sendo comum que alguns indivíduos oriundos de áreas com uma alta frequência para as talassemias, possam herdar genes para mais do que um tipo de talassemia. (6)

Algumas variantes das hemoglobinas possuem uma síntese reduzida ou podem ser altamente instáveis, conduzindo tanto a deficiências estruturais como funcionais das cadeias de globina afectadas, resultando numa condição talassémica que geralmente apresenta uma herança dominante. (6)

O estudo das hemoglobinopatias estabeleceu o seguinte princípio: *Um genótipo mutante pode alterar a função da proteína codificada, o que pode originar um fenótipo clínico distinto.* (2) Ou seja, no caso das hemoglobinopatias, tanto as variantes talassémicas, como as várias hemoglobinas anormais, interagem de modo a produzir um grande espectro de patologias com vários graus de severidade, daí a necessidade de introduzir o seu rastreio nos planos nacionais de saúde de modo a prevenir e controlar os casos mais severos da doença. (1)

A molécula de hemoglobina é essencial à vida. Presente em grandes quantidades no interior dos eritrócitos, como uma solução condensada (33g dL^{-1}), é sintetizada durante o processo de maturação dos eritrócitos, sendo responsável pelo transporte do oxigénio aos tecidos periféricos. Tem ainda outras funções, como o transporte do CO_2 dos tecidos periféricos para os pulmões onde é excretado e acção como tampão, de modo a reduzir as alterações de pH no eritrócito que, de outra forma, seriam esperadas sempre que houvesse formação/entrada de ácidos ou bases no mesmo. (6-8)

Cada molécula é formada por duas estruturas primárias:

- **Heme ou ferroprotoporfirina IX:** constituído por quatro anéis pirrólicos unidos por pontes de metano e ligados a um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}).
- **Globina:** subunidade proteica que consiste em quatro cadeias polipeptídicas. (4)

O heme é essencial para o transporte do oxigénio, enquanto a globina protege o heme da oxidação, torna a molécula solúvel e permite variações da afinidade para o oxigénio. A sua síntese é um processo complexo, que tem lugar nos precursores eritróides, desde o estadio de proeritroblasto até ao de reticulócito (excepto nos eritrócitos maduros). Oito enzimas, sob controlos genéticos distintos, são necessárias para esta síntese. As diferentes etapas da síntese têm lugar tanto na mitocôndria, como no citoplasma. A primeira reacção enzimática e as últimas três ocorrem na mitocôndria, enquanto que as quatro reacções intermédias têm lugar no citoplasma. (6,10)

A fórmula molecular do heme é $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{FeN}_4\text{O}_4$ e tem uma massa molecular de 616,487 g/mol. É um grupo essencialmente plano e ligeiramente dobrado que confere à hemoglobina uma cor característica, sendo constituído por uma parte orgânica e um átomo de ferro, no estado ferroso (Fe^{2+}). É uma estrutura tetrapirrólica, na qual os quatro anéis pirrólicos se encontram ligados por pontes de metano, tendo à periferia 4 radicais metilo, 2 radicais vinilo e 2 radicais propionilo em arranjos diferentes, dos quais a protoporfirina IX é um dos isómeros. O Fe^{2+} encontra-se no centro da protoporfirina IX coordenado por 4 ligações ao azoto de cada anel pirrólico. (6,10)

Ao se unirem entre si, as subunidades proteicas da hemoglobina formam uma estrutura globular onde são dispostas as cavidades que vão alojar o heme. Na sua região central, as quatro cadeias globínicas delimitam um espaço para o 2,3-DPG, um metabolito derivado da glicólise anaeróbica que favorece a libertação de oxigénio. (10)

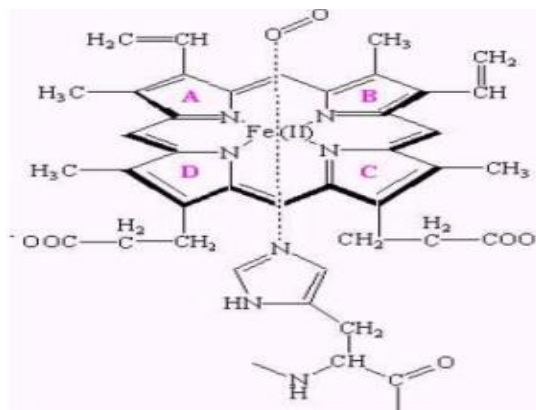


Figura 1: Representação da estrutura do grupo prostético heme (Adaptado de (7))

II.1. Estrutura da Hemoglobina

A molécula de hemoglobina consiste em dois pares de cadeias aminoacídicas idênticas duas a duas, que se ligam no espaço, formando uma estrutura quaternária (tetrâmero elipsoidal) com o peso de aproximadamente 64.000 Da. (8)

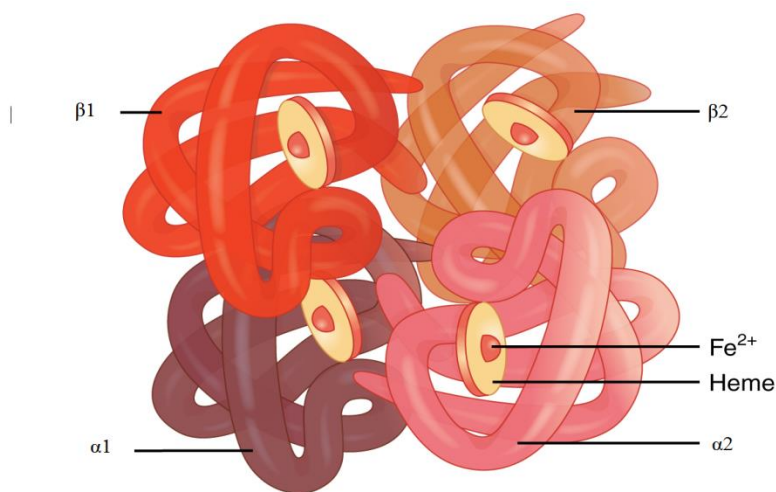


Figura 2: Estrutura da Hemoglobina (Adaptado de (9))

Existem vários tipos de cadeias e cada uma possui uma sequência de aminoácidos precisa, que se mantém completamente conservada de geração em geração (estrutura primária). O tipo de hemoglobina é, assim, determinado através das suas cadeias constituintes que podem ser classificadas como sendo do tipo α , com 141 aminoácidos, ou do tipo β (β , δ , γ), com 146 aminoácidos, diferindo apenas na sequência de aminoácidos.(8)

A estrutura secundária é muito semelhante à primária. Como resultado da formação de ligações não-covalentes de baixa energia entre as cadeias secundárias, cada aminoácido adquire uma estrutura tridimensional, altamente específica, composta por oito segmentos helicoidais designados por letras de A-H, sete segmentos não-helicoidais (NA, AB, CD, EF, FG, GH e HC) e duas terminações N e C. Esta diferença é fundamental, pois os segmentos helicoidais são rígidos e lineares, enquanto, os não-helicoidais são flexíveis. Como o ferro do heme forma uma ligação covalente com a histidina proximal (F8) e o oxigénio se une de forma não-covalente ao heme e à histidina distal (E7), o heme fica suspenso numa fenda não-polar entre os helicoidais E e F, como se pode observar na Figura 3. (10)

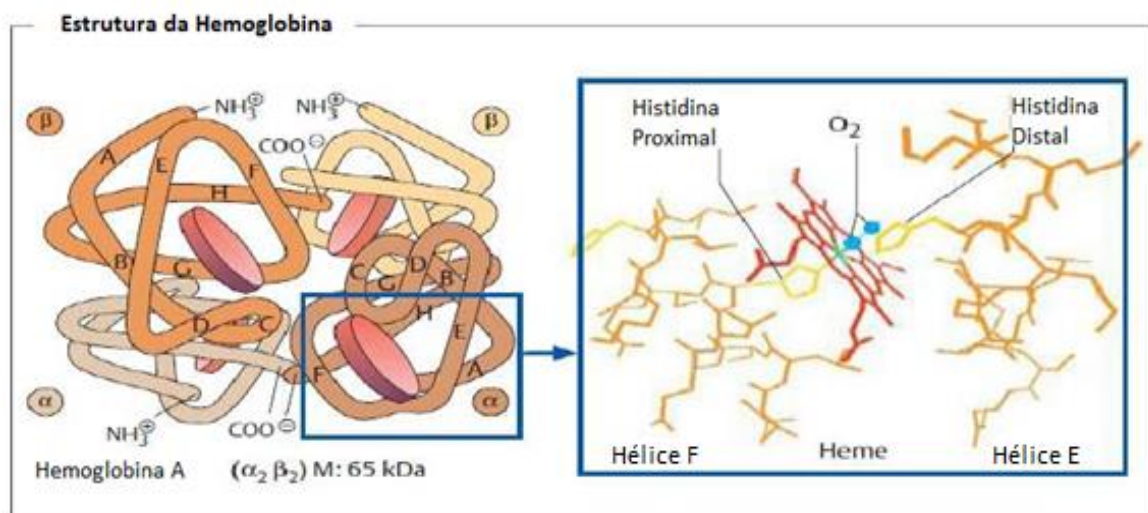


Figura 3: Estrutura tridimensional da hemoglobina com localização dos segmentos helicoidais e representação das ligações das histidinas e oxigénio ao heme (Adaptado de (11))

À medida que a carga eléctrica de cada aminoácido define a sua afinidade para a água (polaridade), os aminoácidos sem carga são orientados para o interior da cadeia de globina, ao contrário daqueles que apresentam carga (arginina, lisina, ácido glutâmico, ácido aspártico e histidina), que se concentram à superfície da molécula e em contacto com a água criando, assim, um ambiente hidrofóbico apropriado para heme, onde a molécula da hemoglobina liga e liberta o oxigénio.(8,10)

A afinidade da molécula de hemoglobina para com o oxigénio está associada a um rearranjo espacial da molécula e é regulada pela concentração de fosfatos, em particular do 2,3-DPG no eritrócito. O 2,3-DPG ao combinar-se com as cadeias β da desoxihemoglobina diminui a afinidade da molécula para com o oxigénio. Quando os grupos heme libertam o oxigénio nos tecidos, as cadeias β são afastadas, permitindo a entrada do 2,3-DPG e o estabelecimento de pontes salinas entre as cadeias. Estas actividades resultam numa diminuição progressiva da afinidade da molécula para o oxigénio. Com a captação de oxigénio nos pulmões, as pontes salinas são sequencialmente quebradas, juntando novamente as cadeias β e expulsando o 2,3-DPG, o que aumenta progressivamente a afinidade da molécula para o oxigénio. (8)

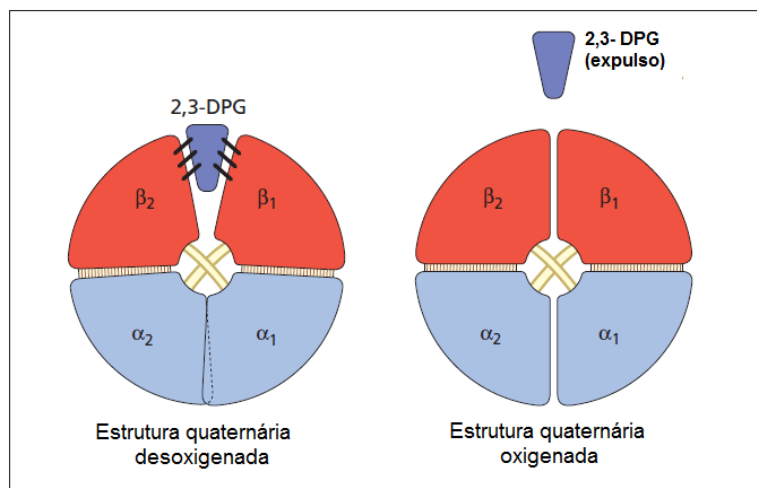


Figura 4: Propriedades alostéricas da hemoglobina (Adaptado de (6)).

II.2 Genes das Globinas

Todos os genes das globinas partilham uma estrutura semelhante, que inclui três sequências codificantes (exões) separadas por duas sequências não-codificantes (intrões, denominados IVS-1 e IVS-2). Estas sequências conservadas, importantes para a expressão dos genes, estão localizadas nas regiões promotoras proximais das fronteiras exão-intrão e nas regiões não traduzidas (UTR), no sentido 5'-3'. (6)

Para além dos elementos promotores e *enhancers* típicos, cada agrupamento possui uma região reguladora, que desempenha um papel crucial na estimulação da expressão dos genes específicos da linhagem eritróide. (6)

II.2.1 Agrupamento génico da α -globina

Em indivíduos normais, a síntese da α -globina é regulada por quatro genes de globina α , localizados no segmento distal da região telomérica do braço curto do cromossoma 16 (16p 13.3). Este agrupamento contém os genes α duplicados ($\alpha 2$ e $\alpha 1$), o gene embrionário ζ , (que codifica as cadeias de globina embrionária ζ), três pseudogenes ($\Psi\zeta 1$, $\Psi\alpha 1$ e $\Psi\alpha 2$) e um gene θ (Figura 5). Os três pseudogenes possuem mutações, não sendo por isso, expressos. (12)

Os genes funcionais estão organizados pela ordem *telómero- ζ - $\alpha 2$ - $\alpha 1$ -centrómero*. A sua expressão está dependente de quatro regiões remotas altamente conservadas (MCS), denominadas MCS-R1 a -R4. Estas sequências, hipersensíveis à acção da enzima DNase I, localizam-se entre os 10 e 50kb a montante do gene da ζ -globina, sendo também designadas como HS-10, HS-33, HS-40 e HS-48 (consoante a distância a que se encontram do gene ζ). (13-14) Destas sequências, a HS-40 (MCS-R2) é considerada a sequência *major*, na expressão do gene α . (12)

Existem diferentes níveis de transcrição nos dois genes α , uma vez que o gene $\alpha 2$ codifica 2-3 vezes mais α -globina do que o gene $\alpha 1$ (a produção de mRNA por parte do gene $\alpha 2$ excede a do $\alpha 1$ numa razão de 1.5 para 3). (15)

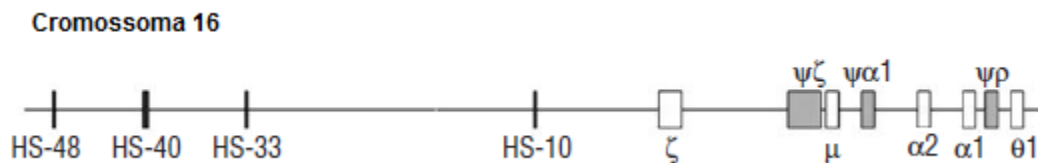


Figura 5: Agrupamento génico da α -globina humana no cromossoma 16. Os genes e pseudogenes estão organizados no sentido 5'-3' de acordo com a sua ordem de expressão na ontogénese. (Adaptado de (14))

II.2.2 Agrupamento génico da β -globina

O gene *HBB* está localizado no braço curto do cromossoma 11 (11p15.5) numa região altamente condensada e está transcricionalmente silencioso em todas as células não-eritróides. (14) Este *cluster* possui igualmente um gene δ , o gene embrionário ϵ , os genes fetais $A\gamma$ e $G\gamma$ e o pseudogene $\Psi\beta 1$. Os cinco genes funcionais estão ordenados

com base na sua ordem de expressão durante a ontogénese, ou seja, 5' - ϵ - γ^G - γ^A - $\Psi\beta$ - δ - β - 3'. A montante do complexo da β -globina, encontra-se a Região de Controlo do Locus (LCR), que consiste em cinco regiões hipersensíveis à DNase I, designadas HS 1-5, distribuídas entre os 6 e os 20kb na extremidade 5' do gene ϵ (Figura 6). O LCR tem um papel crucial na expressão do gene *HBB*, pois além de manter a cromatina num estado de abertura, também funciona como um *enhancer* da transcrição do gene. Na sua ausência, o nível de expressão das β -globinas é baixo. Quatro destas regiões (HS 1-4) são específicas da linhagem eritroide enquanto a HS-5 é ubíqua. (16-17)

Cada célula somática possui dois genes *HBB*, um em cada cromossoma 11. Estes dois genes *HBB* expressam a sua proteína globínica em quantidades que igualam a proteína expressa pelos 4 genes *HBA*. (18)

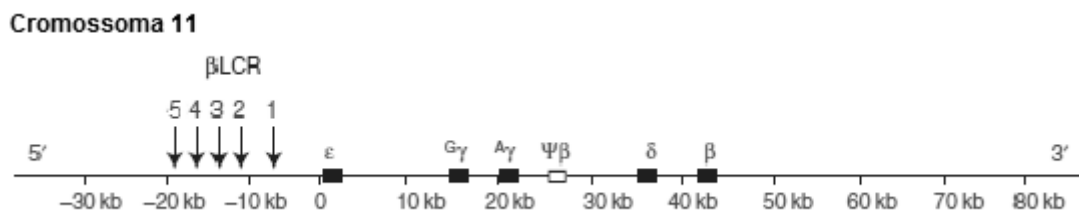


Figura 6: Agrupamento génico da β -globina humana no cromossoma 11. Os genes e pseudogenes estão organizados no sentido 5'-3' de acordo com a sua ordem de expressão na ontogénese (genes embrionários, fetais e do adulto). (Adaptado de (19))

II.3 Expressão diferencial dos genes das globinas durante a ontogénese

A eritropoiese é o processo de formação dos eritrócitos. No adulto a eritropoiese ocorre na medula óssea a partir de uma célula estaminal pluripotente, que origina igualmente as outras células sanguíneas. No entanto, eritropoiese não ocorre sempre no mesmo local.(20) Durante a ontogénese ocorrem alterações fisiológicas ao nível das necessidades em oxigénio, que são acompanhadas de alterações na expressão dos genes das globinas. Isto leva a mudanças progressivas e sequenciais na expressão dos genes das globinas embrionárias, fetais e do adulto, permitindo a formação de diferentes tipos de hemoglobina.(21-22)

Durante a síntese das globinas humanas ocorrem duas comutações ou *switches* essenciais: a passagem da hemoglobina embrionária para a hemoglobina fetal (Hb F), por

volta das 6 semanas de gestação e a troca da hemoglobina fetal pela hemoglobina do adulto, após o parto. (21-22)

As primeiras células com hemoglobina são produzidas no saco vitelino. Segue-se a activação da eritropoiese hepática, principal fonte de eritrócitos durante o desenvolvimento fetal. Mais tarde, tem início a eritropoiese esplénica e medular. (20)

Os primeiros genes a serem expressos correspondem às cadeias ζ (agrupamento génico α) e às cadeias ϵ (agrupamento génico β). A sua síntese tem início nas primeiras semanas do desenvolvimento embrionário, nos eritroblastos primitivos, ainda dentro do saco vitelino, levando à formação da Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$). Por volta das 6 semanas os eritroblastos primitivos começam a sintetizar as cadeias α , β e γ . É nesta fase que as restantes hemoglobinas embrionárias, Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$), são detectadas. (21-22)

Durante o desenvolvimento fetal verifica-se uma grande produção das globinas α e γ (com predomínio da síntese da Hb F). Progressivamente há um aumento da síntese das cadeias β e, já no final do período de gestação, observa-se uma diminuição das cadeias γ , o que leva a um ligeiro aumento da percentagem de Hb A. Na fase adulta, são os eritroblastos da medula óssea que sintetizam a Hb A e as outras fracções menores. (20-22)

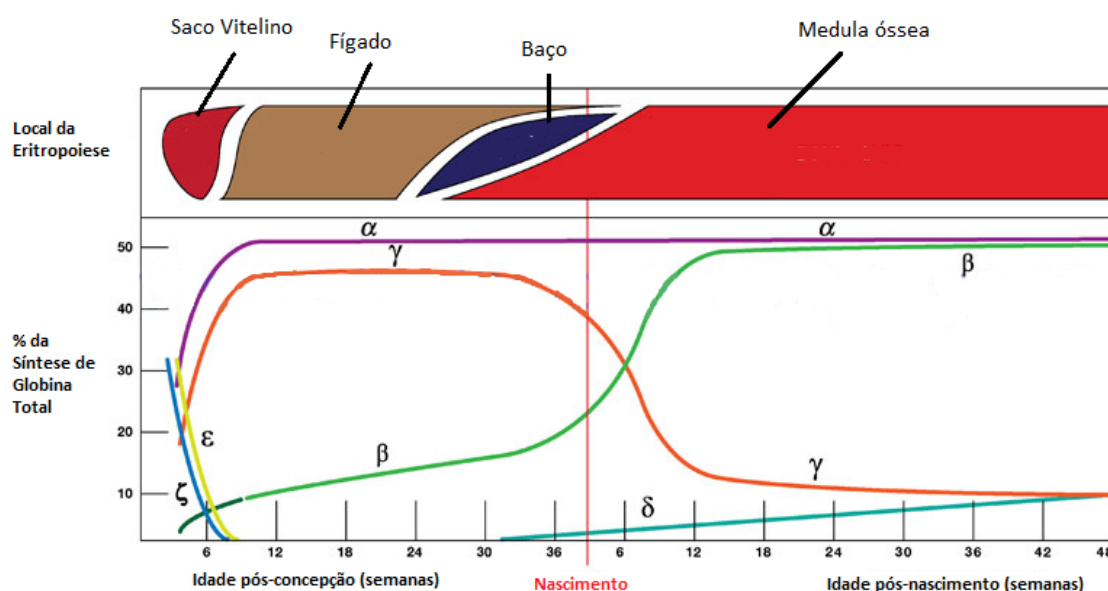


Figura 7: Ontogenia das Hemoglobinas - Sucessão das diferentes hemoglobinas (Adaptado de (23))

- Hemoglobina Embrionária

Entre as 4-14 semanas de gestação, os eritrócitos imaturos do embrião humano produzem três tipos de hemoglobinas primitivas no saco vitelino: Hb Gower 1, Hb Gower 2 e a Hb Portland.

As hemoglobinas Gower 1 e 2 apresentam uma baixa afinidade para o oxigênio, o que possibilita a rápida libertação do mesmo no início da fase embrionária. Já a Hb Portland apresenta uma alta afinidade para o oxigênio, derivada da γ -globina presente na sua composição. No entanto, a sua presença é mais significativa na transição entre o embrião e o feto.

Em condições normais, as duas hemoglobinas Gower desaparecem após o 2º mês de gestação e a Hb Portland pode prolongar-se até ao nascimento, ainda que em quantidades muito reduzidas.

Por volta dos 14 dias de desenvolvimento, após a fixação da placenta, as hemoglobinas embrionárias começam a ser substituídas pela Hb F. Entre as 15-22 semanas de gestação, 53% das células fetais possuem cadeias de ζ -globina e cerca de 5% possuem cadeias de ϵ -globina.

Os eritrócitos de um adulto normal não possuem globinas embrionárias.

- Hemoglobina Fetal

A Hb F é considerada a hemoglobina *major* durante a vida intra-uterina, sendo a variedade de hemoglobina predominante no feto e no recém-nascido. Possui uma afinidade para o oxigênio superior à da Hb A, o que facilita a transferência de oxigênio entre a mãe e o feto. (6)

A Hb F surge por volta da 5ª semana de gestação e persiste durante vários meses após o nascimento. Está associada à eritropoiese hepática, uma vez que a medula óssea só se estabelece como órgão hematopoiético primário às 18-24 semanas de gestação.

As cadeias de γ -globina diferem das cadeias de β -globina em cerca de 39-40 resíduos de aminoácidos, caracterizando-se pela presença de um resíduo de glicina ou alanina na posição 136. O codão da glicina está presente no gene γ^G (*HBG2*) e o codão da alanina caracteriza o gene γ^A (*HBG1*). A percentagem de hemoglobina fetal no recém-nascido varia entre os 55-85% da hemoglobina total. Durante a vida intra-uterina e à nascença, a Hb F apresenta um rácio γ^G - γ^A de aproximadamente 2:1 a 3:1. Após os

primeiros meses de vida, este rácio altera-se significativamente para 2:3 (rácio do adulto). (6,24)

Um ano após o nascimento, observa-se uma redução dos valores observados após o parto (cerca de 55-85% da hemoglobina total) para os valores residuais de Hb F observados na maioria dos adultos. Isto deve-se à gradual substituição da Hb F pela Hb A nos eritrócitos circulantes até se atingirem os níveis normais de Hb F no adulto (<1%). Em condições normais, o declive da Hb F é de tal forma rápido que, aos seis meses de vida, só se detecta cerca de 5% desta hemoglobina no bebé. No entanto, podem existir variações importantes consoante o grupo étnico. (24)

- Hemoglobina A e A₂

A Hb A constitui aproximadamente 98% do conteúdo da hemoglobina total nos eritrócitos do adulto. Apesar da sua predominância no adulto, a variante A₂ (HbA₂) também está presente em pequenas quantidades (2-3%). (1)

Hb A é composta por duas cadeias polipeptídicas α e duas cadeias β ($\alpha_2\beta_2$). Cada subunidade consiste numa cadeia de globina que envolve o grupo heme, o qual contém o ferro a que se vai ligar o oxigénio. Este complexo origina uma configuração espacial globular, necessária à função respiratória. (1)

A produção de cadeias δ inicia-se por volta da 25^a semana de gestação, em concentrações residuais, permanecendo nestes níveis até ao nascimento, onde atinge quantidades perceptíveis, o que origina um aumento dos seus níveis durante os primeiros 6 meses de vida, até se atingirem os níveis do adulto. Estas cadeias, quando ligadas às cadeias α dão origem à hemoglobina A₂. (22)

Pode-se assim concluir que, 40 semanas após o nascimento, o bebé apresenta as percentagens de hemoglobina próprias do adulto, ou seja, existe uma estabilidade das hemoglobinas.

Tabela 1: Hemoglobinas presentes os períodos de vida embrionária, fetal e adulta (Adaptado de (22))

Período de desenvolvimento	Tipo de Hemoglobina	Cadeias globínicas	Período preponderante de síntese
Embrionário	Gower 1	$\zeta_2\epsilon_2$	Embrião/até ao 3º mês de gestação
	Gower 2	$\alpha_2\epsilon_2$	
	Portland	$\zeta_2\gamma_2$	
Fetal	Hemoglobina F	$\alpha_2\gamma_2^{\text{G ou A}}$	Feto/até ao 6º mês de vida
Adulto	Hemoglobina A	$\alpha_2\beta_2$	Vida adulta
	Hemoglobina A ₂	$\alpha_2\delta_2$	Feto/vida adulta

As hemoglobinopatias são doenças monogénicas, de transmissão autossómica recessiva, resultantes de mutações que afectam os genes responsáveis pela síntese de hemoglobina, ou as suas regiões reguladoras. (25) No entanto, algumas hemoglobinopatias podem derivar da herança de um gene autossómico dominante que dará origem a casos de anemia hemolítica, quando num estado de heterozigotia que, ao contrário das patologias associadas aos genes autossómicos recessivos, que necessitam de um estado de homozigotia para produzir doença. (4)

Estas patologias podem apresentar manifestações hemolíticas. Aproximadamente 25% das hemoglobinopatias, demonstram uma diminuição do tempo de vida dos eritrócitos, devido a deformações nas membranas celulares características dos estados hemolíticos. (4)

Com base no gene(s) envolvido(s) e o tipo de defeito, as hemoglobinopatias podem ser classificadas como talassemias (α , β , $\delta\beta$) ou variantes estruturais da hemoglobina. Contudo, existem variantes estruturais, como a Hb Lepore e a HbE, que resultam em fenótipos talassémicos. (26)

Existem, igualmente, alguns estados homozigóticos que originam fenótipos clinicamente significativos, de severidade variável (por exemplo, talassemia *major*, talassemia intermédia, síndromes falciformes e síndromes da Hb E), contrariamente aos fenótipos heterozigóticos, geralmente assintomáticos, apesar da presença de algumas características hematológicas que podem ser úteis na identificação da patologia. (26)

Algumas patologias derivam da presença de Hb S, Hb C, Hb E que, no caso da β -talassemia, podem conferir aos heterozigotos um maior grau de resistência à malária, quando comparados com indivíduos normais. A alta taxa destas desordens nas zonas tropicais e sub-tropicais, dentro da cintura da malária, levou à proposta de que estas patologias possam actuar como agentes selectivos, responsáveis pela perda dos genes nos síndromes talassémicos e drepanocíticos, conduzindo à morte prematura dos homozigotas e ao aumento do valor adaptativo dos heterozigotas em ambientes com malária. (21) Assim, em locais onde o paludismo era endémico, os portadores estavam mais protegidos e sobreviviam, acabando por se reproduzir, aumentando a frequência genética e gerando um equilíbrio populacional, em relação aos óbitos, provocados pelos casos mais severos de homozigotia. (5)

- Epidemiologia

Estima-se que existam cerca de 270 milhões de portadores de hemoglobinopatias e cerca de 300 a 500 mil casos de nascimentos de bebês com drepanocitose e formas severas de talassemia. O Sudoeste Asiático, onde predominam as talassemias e a Hb E, é umas das zonas mais atingidas por este fenómeno. Já a África subsariana possui o segundo maior foco, consequência da alta incidência da Hb S. (5)

O gene para a Hb S está distribuído pela África subsariana, Subcontinente Indiano, Médio Oriente, onde a frequência genética ronda os 5-40% ou mais. A Hb E é encontrada no extremo oriental e ao longo do Sudoeste Asiático, onde as taxa de portadores pode exceder os 60%. (27)

A talassemia é frequente nos países da bacia mediterrânica e em algumas zonas de África, assim como no Médio Oriente, subcontinente Indiano, sudoeste Asiático e nas Ilhas do Pacífico. A α^+ -talassemia ocorre ao longo dos trópicos, atingindo frequências altíssimas em algumas populações, enquanto a α^0 -talassemia é restrita a algumas partes do Sudoeste Asiático e bacia do Mediterrâneo. (27)

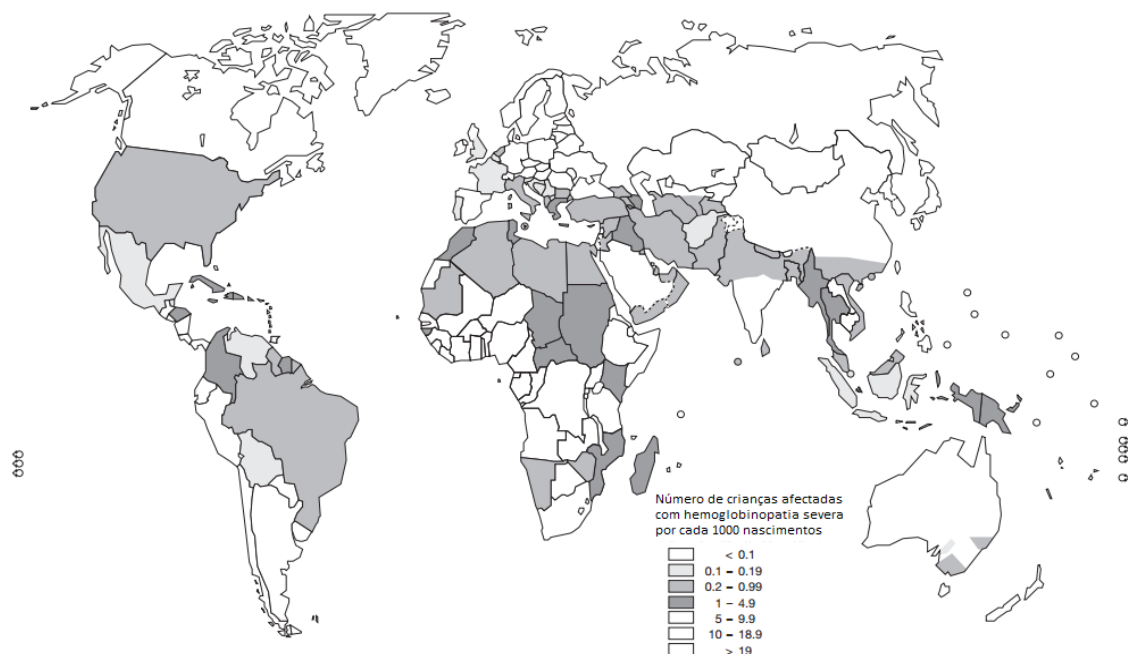


Figura 8: Distribuição global das hemoglobinopatias baseados no número de crianças afectadas em cada 1000 nascimentos (Adaptado de (28))

Os fenómenos de migração populacional, em particular do Brasil, dos PALOP e da Europa de Leste, constituem um problema, no que respeita à detecção de portadores de hemoglobinopatias, que deve ser alargada a todo o território nacional. Com base nesta ideia, foram elaborados rastreios a nível nacional, realizados pelo Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis (DPS) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), em colaboração com várias entidades de saúde e laboratórios dedicados ao estudo molecular dos genes das globinas (Departamento de Genética Humana do INSA), com o intuito de prevenir o aparecimento de formas graves de hemoglobinopatias. (25)

Embora os portadores de hemoglobinopatias se encontrem maioritariamente nas regiões a Sul do país como Algarve, Alentejo, Lisboa e Vale do Tejo, têm sido diagnosticados vários casos na região Norte, nomeadamente β -talassemia e Hb Lepore, o que sugere uma dispersão geográfica de portadores. (25)

Nos últimos anos, verificou-se uma acentuada migração interna no país e o acolhimento de um número crescente de imigrantes provenientes de países como a Ásia, Brasil e Europa de Leste (onde a variante Hb O-Arab é frequente), áreas com elevada prevalência de hemoglobinopatias com características genéticas distintas. (25,29)

III.1 Talassemias ou Hemoglobinopatias Quantitativas

O termo talassemia classifica um grupo de doenças sanguíneas, caracterizadas pela redução ou ausência de síntese das cadeias de globina normais e consequente diminuição da síntese da hemoglobina. Consoante a cadeia cuja síntese é comprometida, as talassemias são denominadas α -, β -, γ -, δ -, $\delta\beta$ -, ou $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassemias. (31)

A redução significativa da síntese de um tipo de cadeia globínica, altera o equilíbrio normal entre as cadeias α e β , conduzindo à acumulação intracelular de uma delas, o que resulta em efeitos patológicos, como a destruição precoce dos precursores eritróides antes de alcançarem o estado de completa maturação. Os eritrócitos que superam este transtorno maturativo, apresentam precipitados abundantes de cadeias de globina em excesso que, invariavelmente, diminuem o seu tempo de vida em circulação (hemólise). (32)

As talassemias podem resultar de deleções de uma grande parte do gene e até mesmo da sua totalidade (α -talassemia), ou de uma pequena deleção/mutação do gene (β -talassemia). As mutações nos genes α e β têm uma importância clínica significativa, pois

resultam numa síntese reduzida da hemoglobina A. No entanto, os quadros clínicos mais severos, surgem quando estas mutações afectam ambos os genes *HBB* ou 3-4 dos genes *HBA*. (6)

A γ -talassemia apenas apresenta significado clínico na vida intra-uterina ou nos primeiros meses de vida, uma vez que é nesta fase, que a Hb F apresenta maiores concentrações. A δ -talassemia não apresenta significado clínico, excepto nos casos em que a sua presença interfere com o diagnóstico de uma β -talassemia coexistente. (6)

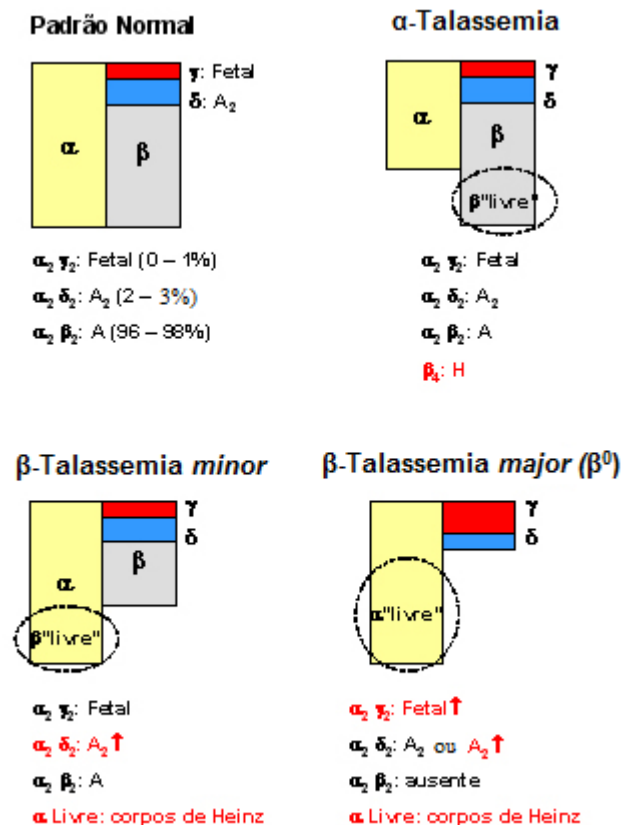


Figura 10: Padrão normal da síntese das hemoglobinas em comparação com α -talassemia, β -talassemia *minor* e β -talassemia *major*. (Adaptado de (33))

A hereditariedade das talassemias apresenta um padrão autossómico recessivo, sendo a sua frequência na população mundial bastante elevada. Em alguns países mediterrânicos, mas especialmente em algumas zonas da Ásia e África, as talassemias continuam a ser um grave problema de saúde pública que obriga à implantação de programas de prevenção e diagnóstico pré-natal. (34)

As manifestações clínicas variam desde microcitoses assintomáticas a anemias profundas que, por vezes, são incompatíveis com a vida e podem provocar a morte *in*

útero. Esta diversidade clínica resulta dos diversos graus de severidade, resultantes do defeito genético primário na síntese da hemoglobina e da co-hereditariedade de factores modulantes, como a capacidade de sintetizar grandes quantidades de Hb F. (35)

Tabela 2: Classificação das Talassemias (Adaptado de (6))

Tipo de Talassemia	Cadeia ou cadeias com síntese reduzida	Hemoglobina ou hemoglobinas sintetizadas numa taxa diminuída
Alfa: α^+ ou α^0	α	A, A ₂ e F
Beta: β^+ ou β^0	β	A
Gama: γ	γ	F
Delta: δ^+ ou δ^0	δ	A ₂
Delta Beta: $\delta\beta^0$ ou $\delta\beta^+$	δ e β	A e A ₂
Gama Delta Beta: $\gamma^A\delta\beta^0$	γ , δ e β	A e A ₂
Epsilon, Gama Delta Beta: $\epsilon\gamma^G\gamma^A\delta\beta$	ϵ , γ^G , γ^A , δ e β	A, A ₂ e F
Hb Lepore	δ e β	A e A ₂

III.1.1 β -Talassemia

A β -talassemia é prevalente nos países mediterrânicos, Médio Oriente, Ásia central, Índia, Sul da China e Extremo Oriente, assim como nos países da costa norte africana e na América do Sul. Pensa-se que a sua alta frequência genética nestas regiões esteja relacionada com a pressão selectiva do *Plasmodium falciparum* (agente casual da malária), uma vez que a sua distribuição pode ser correlacionada com as zonas onde existe/existiu paludismo endémico, exercendo um efeito protector contra o parasita, que se traduz numa pressão genética positiva desta a população afectada. (17,35-36)

As bases moleculares da β -talassemia são extremamente heterogéneas, tendo já sido descritas mais de 200 mutações distintas. Estas mutações podem afectar todos os passos de expressão do gene da globina com a transcrição, processamento do precursor de mRNA, tradução do mRNA maduro e preservação da integridade pós-tradução da cadeia β . As consequências destes defeitos dependem, assim, do tipo de mutação e do local atingido, podendo afectar a expressão do gene da β -globina.(34-35)

A maioria das mutações são pontuais e afectam um único nucleótido ou um pequeno número de nucleótidos no gene *HBB*, apesar de já terem sido descritos alguns casos de deleções. Uma dessas deleções é provocada por um *crossing over* desigual entre os genes homólogos da δ - e β -globina, que origina um gene de $\delta\beta$ -globina ou gene de Lepore, que possui uma baixo nível de expressão. Grandes deleções que envolvem uma parte ou a totalidade do agrupamento génico do *HBB*, são responsáveis pelas $\delta\beta$ -talassemias, $\epsilon\delta\beta$ -talassemias e síndromes da PHHF. (37)

A inactivação completa do gene *HBB* resulta na ausência de produção de β -globina, denominando-se β^0 -talassemia. A produção diminuída de β -globina, pode ser classificada, de acordo com o grau de redução quantitativa da sua síntese, em β^+ ou β^{++} -talassemia. Esta redução quantitativa da β -globina resulta numa acumulação excessiva das cadeias de α -globina, responsáveis pela patofisiologia da doença. Assim, a severidade destes fenótipos, está normalmente relacionada com o grau de desequilíbrio entre a síntese de cadeias de α e β -globina e a dimensão do conjunto de cadeias α livres. (38)

Tabela 3: Mutações que resultam em fenótipos de β -talassemia (Adaptado de (6))

Tipo de Mutação	Consequência	Fenótipo
Delecional		
Grande deleção envolvendo o gene β	Ausência de transcrição, hemoglobina A anormalmente elevada em heterozigotas	β^0 -talassemia
Pequena deleção 5' do gene β	Transcrição reduzida	β^+ -talassemia
Não-delecional		
Inserção no IVS2	Transcrição reduzida	β^+ -talassemia
Mutações nas sequências promotoras proximais ou distais, CACCC box ou TATA box	Transcrição reduzida e aumento da transcrição da γ e δ	β silencioso, (β^{++})-talassemia intermédia ou β^+ -talassemia
Mutação nas sequências promotoras 5', perto do CAP	Transcrição reduzida e tradução; instabilidade do mRNA	Silenciado ou (β^{++})-talassemia intermédia
Mutação no codão de iniciação	Ausência de transcrição	β^0 -talassemia (mais severa)
Mutações no <i>splicing</i> do RNA envolvendo nucleótidos invariáveis, tanto nos locais de aceitação, como de doação	Ausência de mRNA devidamente processado	β^0 -talassemia
Mutações no <i>splicing</i> do RNA envolvendo os nucleótidos		Silenciamento, (β^{++})-talassemia intermédia, β^+ -

adjacentes às sequências consenso	Processamento do mRNA ineficiente	talassemia ou, ocasionalmente, β^0 -talassemia
Mutações no <i>splicing</i> do RNA com activação dos locais de clivagem num intrão ou exão, com ou sem alteração na sequência codificante	mRNA aberrante é produzido juntamente com o mRNA normal, por vezes uma cadeia β estruturalmente anormal pode ser produzida, podendo ser altamente instável.	(β^{++})-talassemia intermédia, β^+ -talassemia, β^0 -talassemia; β -talassemia dominante; Hb E, Hb Knossus ou Hb Malay
Mutações que interferem com a poliadenilação e, consequentemente, com a clivagem do mRNA	Transcrição de mRNA alongado e instável	β^+ - talassemia ou (β^{++})-talassemia intermédia
Outras mutações que interferem com o processamento do mRNA	Processamento anormal do mRNA	Silenciamento, β^+ -talassemia ou (β^{++})-talassemia intermédia
Codão de finalização prematuro e consequente alteração de um único nucleótido ou uma mutação <i>frameshift</i>	Tradução ausente (mutações nos exões 1 e 2) ou transcrição de mRNA aberrante (mutações no exão 3)	β^0 -talassemia (mutações nos exões 1 e 2) ou β -talassemia dominante (mutações no exão 3)
Outras hemoglobinopatias talassémicas provocadas pela alteração de um único nucleótido	Transcrição reduzida de mRNA anormal; transcrição de RNA codificante para uma cadeia β muito instável	Hb North Shore; Hb Vicksburg, Hb Indianapolis, Hb Geneva
Outras hemoglobinopatias talassémicas associadas a mutação dum codão de finalização que passa a sequência codificante	Síntese de mRNA alongado e cadeia β	Hb Tak, Hb Cranston, Hb Saverne
Hb Lepore	Fusão dos genes $\delta\beta$ com síntese reduzida de cadeia $\delta\beta$ aberrante	Hb Lepore Boston, Hb Lepore Baltimore, Hb Lepore Hollandia
Hemoglobinas instáveis	Instabilidade da hemoglobina que leva a uma rápida degradação pós-transcrição	Hb Showa-Yakushigi, Hb K-Woolwich
Mutação no gene GATA1	Transcrição reduzida	Talassemia com trombocitopenia
Mutação no gene XPD (19q13.2-13.3)	Transcrição reduzida	Talassemia e Tricotiodistrofia

III.1.1.1 Tipos de β -Talassemia

A forma de hereditariedade das talassemias, assim como de outras alterações genéticas da hemoglobina, é autossômica, e os termos dominante ou recessivos são de difícil aplicação, uma vez que alguns heterozigotos apresentam distúrbios clínicos claros, ao passo que outros não. No entanto, a β -talassemia é considerada uma herança autossômica recessiva, pois são necessários dois genes anormais de β -globina para produzir um fenótipo clinicamente detectável. Recentemente, têm sido identificadas formas dominantes de β -talassemia, que resultam em fenótipos de talassemia intermédia para portadores de um único gene alterado.

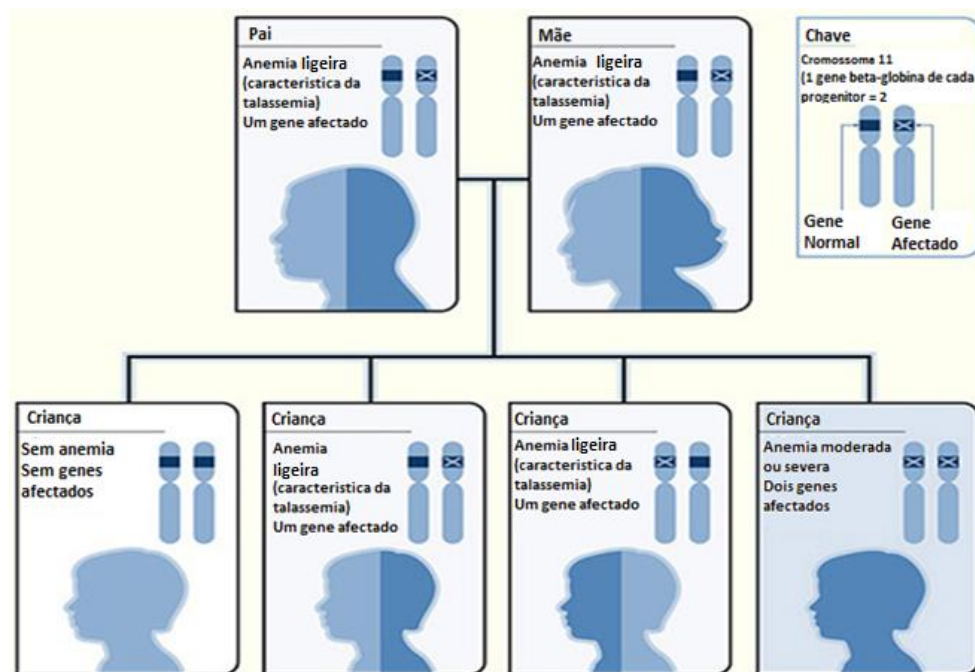


Figura 11: Exemplo de padrões de hereditariedade para β -talassemia (Adaptado de (39))

- β -talassemia *minor*

Os portadores de β -talassemia (ou heterozigotas) são frequentemente assintomáticos, podendo (ou não) apresentar hemogramas sugestivos de anemia microcítica e hipocrômica ligeira, contagem eritrocitária elevada e concentrações de hemoglobina bastante dispersas. (24) Este quadro faz com que este transtorno genético seja facilmente confundido com situações de anemia ferropénica, podendo ser alvo de

terapêuticas desnecessárias. A absorção de ferro encontra-se aumentada e a administração inadequada de terapêuticas com ferro pode resultar em sobrecargas nocivas. (40)

Verifica-se, ainda, uma redução da síntese de β -globina, que leva a uma incapacidade de produzir quantidades suficientes de Hb A, desencadeando, assim mecanismos compensatórios, que aumentam a produção de cadeias de δ - e γ -globina, o que leva, por sua vez, à elevação dos níveis de Hb A₂ e Hb F. (17)

Regra geral, esta condição só é diagnosticada a partir de estudos familiares, descoberta acidentalmente em exames de rotina, durante a pesquisa de outras patologias ou como parte de um estudo populacional. Ocasionalmente, e particularmente durante a gravidez, a presença de anemia moderada pode alertar o clínico para a presença de um possível portador. (24)

Quando ambos os pais são portadores, em cada gravidez existe 25% de risco de homozigotia para a criança. (36)

- β -talassemia intermédia

Existem algumas síndromes talassémicas que se caracterizam por não serem tão severas quanto as variantes dependentes de transfusões. Estas formas intermédias da β -talassemia resultam de interações de vários alelos distintos, seja entre eles ou com os alelos das variantes das hemoglobinas. (24)

Indivíduos com β -talassemia intermédia apresentam clinicamente um padrão marcadamente heterogêneo, podendo apresentar palidez, icterícia, hepatoesplenomegalia, alterações esqueléticas severas ou moderadas, massas extra-medulares de medula eritróide hiperplásica, tendência para osteopenia e complicações trombóticas resultantes de um estado de hipercoagulação, derivado da composição da membrana lipídica das células sanguíneas (especialmente nos doentes que sofreram esplenectomia). Normalmente, nestes casos, não são necessárias de transfusões. (17) Mesmos nos casos mais severos da doença, os doentes com idades entre os 2 e os 6 anos são capazes de sobreviver sem transfusões regulares, mas apresentam atrasos de crescimento/desenvolvimento. Nos casos mais ligeiros, os doentes são completamente assintomáticos até a idade adulta, à excepção da presença de anemia ligeira. (36) Estes doentes correm um certo risco de sobrecarga de ferro, devido ao aumento da absorção intestinal do mesmo, resultante de uma eritropoiese ineficiente. (17,36)

- *β-talassemia major* (Anemia de Cooley)

A maioria das formas de *β-talassemia major* são definidas como alterações genéticas da síntese das cadeias de β -globina, cuja sobrevivência do doente só é possível através de transfusões sanguíneas regulares. (24)

A *β-talassemia major* resulta de estados homozigóticos ou heterozigóticos com uma mutação dupla no gene *HBB*. Na β^0 -talassemia, a forma mais severa, nenhuma cadeia de β -globina é sintetizada. Neste caso, apenas a Hb A₂ e a Hb F estão presentes na electroforese. Quando são sintetizadas pequenas quantidades de cadeias de β -globina, esta condição passa a denominar-se β^+ -talassemia. Aqui, a electroforese das hemoglobinas irá apresentar Hb A, Hb A₂ e Hb F. (41)

A apresentação clínica da talassemia *major* ocorre entre os primeiros 6-24 meses de vida, (36) o que corresponde ao período em que se observa a substituição da síntese das cadeias γ pelas cadeias β , que tem lugar nos primeiros meses de vida. (24)

As crianças afectadas apresentam problemas de crescimento e adquirem uma palidez progressiva. Problemas na alimentação, diarreias, irritabilidade, picos de febre recorrentes e alargamento progressivo do abdómen, derivado do aumento do baço e do fígado, podem ocorrer. Nestes casos, é iniciada uma terapêutica transfusional regular, que visa manter uma concentração mínima de hemoglobina entre os 95-105 g/L. Se o tratamento for bem realizado, a criança pode apresentar um crescimento e desenvolvimento normal até aos 10-11 anos. Após atingir esta faixa etária, as crianças afectadas encontram-se em risco de desenvolver complicações muito sérias, relacionadas com a sobrecarga de ferro pós-transfusional, estando dependentes do sucesso da terapia de quelação. (17, 36)

Nas crianças, a sobrecarga de ferro pode conduzir a atrasos de crescimento e a falhas na maturação sexual. Mais tarde, estas complicações podem incluir problemas cardíacos (miocardiopatia dilatada ou, raramente, arritmias), hepáticos (fibrose ou cirrose) e endócrinos (diabetes *mellitus*, hipogonadismo e insuficiência da paratiróide, tiróide, glândula pituitária e, menos vulgarmente, das glândulas adrenais). Outras complicações que podem ocorrer são esplenomegalia, hepatite crónica (resultante da infecção com vírus), infecção por HIV, trombose venosa e osteoporose. (17, 36)

A frequência e severidade das complicações destas *β-talassemias* depende muito da regularidade da terapêutica transfusional, que é de extrema importância, pois um individuo que não tenha recebido um tratamento transfusional adequado tem uma

esperança média de vida de 20-30 anos. Já os que recebem transfusões regulares e fazem o tratamento com os quelantes do ferro podem estender a sua esperança média de vida até aos 40 anos. (17, 24, 36)

Tabela 4: Tipos de β -talassemia e sua descrição clínica (Adaptado de (4))

Fenótipo	Descrição Clínica
β -talassemia <i>minor</i>	Anemia ligeira, microcitose, morfologia eritrocitária anormal, esplenomegalia
β -talassemia intermédia	Anemia moderada e eritropoiese ineficiente, microcitose, morfologia eritrocitária anormal, esplenomegalia, sobrecarga de ferro, não-dependentes de transfusões
β -talassemia <i>major</i>	Anemia severa provocada por eritropoiese ineficiente, dependente de transfusões, danos nos órgãos (coração, fígado, etc) secundários à sobrecarga de ferro, eritropoiese extramedular, hepatoesplenomegalia

- δ - Talassemia

Apesar da δ -talassemia ser clínica e hematologicamente silenciosa, a sua co-hereditariedade com a β -talassemia pode provocar alguns problemas em casos de aconselhamento genético. Resulta de uma deleção de ambos os genes δ e β que conta, contudo, com a preservação dos genes γ , podendo produzir um fenótipo hematológico, onde a Hb A₂ não se encontra elevada, ocultando assim um possível diagnóstico de uma β -talassemia *minor* (6,24)

Tanto o estado heterozigótico como o homozigótico para δ^+ -talassemia apresentam uma percentagem de Hb A₂ reduzida. Nos casos de δ^0 -talassemia heterozigótica, a Hb A₂ encontra-se igualmente diminuída mas, nos estados homozigóticos pode estar completamente ausente. (6)

As mutações responsáveis pela δ -talassemia incluem uma grande deleção, mutações pontuais e *frameshift*. As mutações não-delecionais podem produzir codões STOP prematuros ou interferir tanto no processo de transcrição do RNA como na sua tradução. (6)

- $\delta\beta$ -Talassemia ou Hemoglobina Lepore

A β/δ -talassemia é caracterizada pela síntese reduzida ou ausente das cadeias de β - e δ -globina e por um aumento variável da síntese das cadeias γ , que consegue balancear, parcialmente, a síntese deficiente das duas cadeias. Nestes casos, o mecanismo molecular mais frequente consiste em deleções de extensão variável no *cluster* das β -globinas, que engloba os genes da β - e δ -globina. (32)

Os portadores heterozigóticos de β/δ^0 -talassemia apresentam leves alterações eritrocitárias, quando em comparação com o observado no padrão de β - talassemia. Regra geral, o VGM e o HGM apresentam valores que rondam os 70 fl e os 24 pg, respectivamente. A Hb A₂ encontra-se normal ou reduzida e a Hb F aumentada (5 a 20%) e distribuída heterogeneamente entre os eritrócitos. (31)

Os portadores homozigóticos (β/δ^0) apresentam um quadro clínico semelhante ao da β -talassemia intermédia. A Hb F constitui 100% da concentração total da hemoglobina, devido à ausência de síntese das hemoglobinas A e A₂ e a fragilidade osmótica e o HGM estão diminuídos. (6, 24)

A δ/β^+ -talassemia está geralmente associada à produção de uma variante de hemoglobina estrutural da hemoglobina, denominada Lepore (Hb Lepore). A Hb Lepore contém cadeias α normais e cadeias β , que consistem nos primeiros 50-80 resíduos de aminoácidos das cadeias δ e os últimos 60-90 resíduos da sequência de aminoácidos C-terminal das cadeias β . Deste modo, a cadeia Lepore não- α é nada mais que uma fusão da cadeia β . (17) Já foram descritas várias variantes da hemoglobina Lepore – Washington, Boston e Hollandia – e em cada uma delas observam-se transições das sequências δ para as β que ocorrem em diferentes pontos. A fusão das cadeias, deriva de um *crossing over* não-homólogo entre parte do *locus* δ de um cromossoma, com parte do *locus* β do cromossoma complementar, como se pode observar na Figura 12. (15)

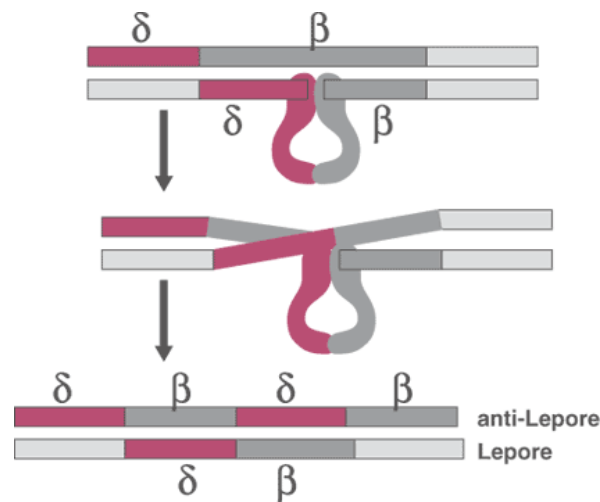


Figura 12: Origem do gene da Hb Lepore através de um *crossing over* não-homólogo do DNA durante a meiose. (Adaptado de (42))

Apesar de não sintetizarem cadeias β e δ normais, os doentes apresentam diversos fenótipos clínicos que podem ir desde quadros bastante semelhantes aos quadros de β^0 -talassemia homozigótica, a formas relativamente leves de β -talassemia intermédia. Os estados heterozigóticos para as talassemias Hb Lepore são geralmente assintomáticos e as alterações hematológicas muito semelhantes às da β -talassemia, com excepção dos níveis de Hb F que, aqui, se encontra significativamente mais elevada. (24)

- **Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF)**

Geralmente, a produção de hemoglobina fetal diminui rapidamente poucos meses após o nascimento e apenas é detectada em quantidades residuais ao longo da vida (<1% da hemoglobina total). Normalmente, esta produção está confinada a uma pequena subpopulação de eritrócitos denominados, células F (células fetais), onde o perfil da expressão do gene da globina fetal ainda se encontra activo. (6)

Regra geral, a PHHF apresenta uma elevada percentagem de Hb F e uma síntese de cadeias globínicas bastante equilibrada. As mutações responsáveis por este aumento da síntese da Hb F são sobretudo deleções, apesar de já terem sido descritas algumas mutações não-delecionais. (35)

III.1.2 α -Talassemia

As mutações causadoras de α -talassemia ocorrem um pouco por todo o mundo, sendo bastante comuns na China e sudeste Asiático, onde cerca de 40% da população é portadora. Existe ainda uma alta frequência nas regiões do Mediterrâneo e Médio Oriente. (43)



Figura 13: Distribuição mundial da α -talassemia. A área colorida representa as áreas afectadas. (Adaptado de (44))

As α -talassemias são diferenciadas e classificadas de acordo com o número de genes α lesados, destacando-se ainda o grau de lesão que pode ser variável, afectando parcial ou totalmente o gene. (33)

O defeito genético mais comum é a deleção que se sobrepõe às trocas de bases nitrogenadas. O gene *HBA* é duplicado, originando 2 genes de α -globina por cada genoma haplóide de onde podem resultar desde uma a quatro deleções deste gene.

A classificação das α -talassemias varia desde α^0 -talassemia, onde não é produzida nenhuma α -globina normal, a α^+ -talassemia, onde o produto das globinas é reduzido. Quando se observa apenas uma deleção de um único gene e três genes intactos ($-\alpha/\alpha\alpha$), não se verificam anomalias significativas e diz-se que estamos perante um portador

silencioso. Duas deleções de gene ($--/\alpha\alpha$) provocam uma situação clínica menor, sendo responsáveis por situações de anemia microcítica e hipocrômica semelhantes ao quadro de anemia ferropénica. A deleção de 3 genes ($--/-\alpha$), também conhecida como doença da Hb H, resulta em casos de anemia microcítica e hipocrômica moderada, com hepatoesplenomegalia proveniente da hematopoiese extra-medular. Por fim, a deleção dos 4 genes ($--/--$) é incompatível com a vida e resulta em *hidrops fetalis*, associada à Hb de Bart, com morte *in útero*, verificando-se a ocorrência de abortos por volta das 30 semanas de gravidez ou pouco depois do nascimento. (33)

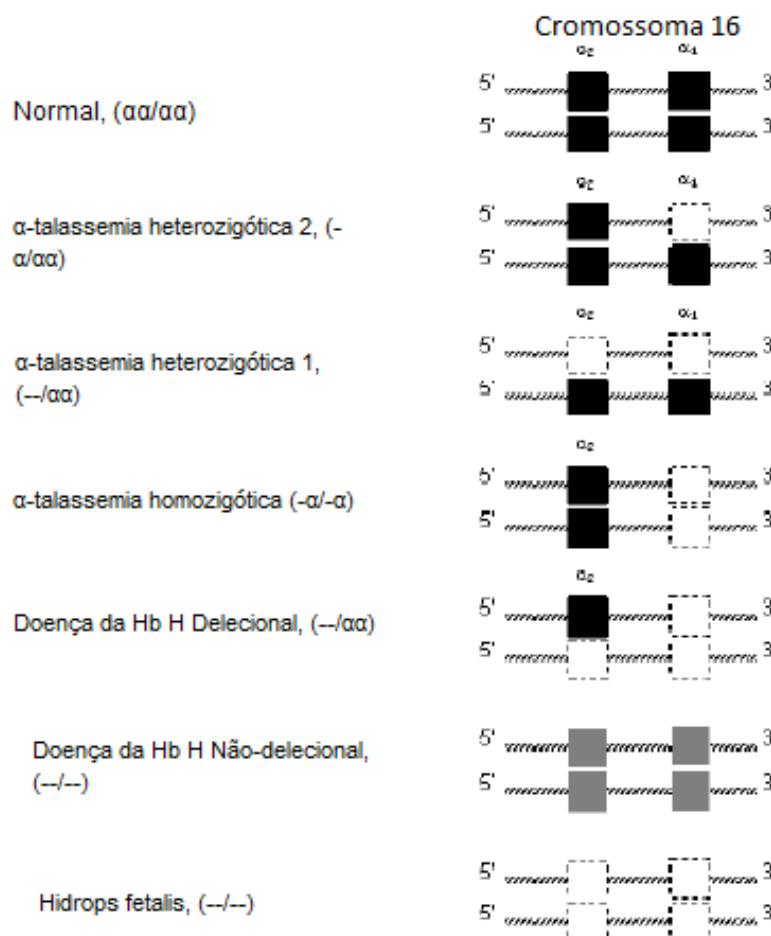


Figura 14: Diagrama representativo das deleções do gene da α -talassemia. (Adaptado de (44))

- **Mutações Delecionais e Não-Delecionais**

Existem mais de 35 deleções conhecidas, sendo as mais comuns a SEA e a Mediterrânica (MED). Os estados heterozigóticos para a α -talassemia (α^+) resultam da deleção de um gene da α -globina ($\alpha^-/\alpha\alpha$). As deleções mais comuns variam entre os 3.7kb e os 4.2kb. Se ambos os progenitores forem portadores, pode haver transmissão, resultando numa deleção de dois genes nos dois cromossomas ($\alpha^-/\alpha\alpha$). O estado homozigótico de um portador α -talassémico ocorre quando ambos os genes de um mesmo cromossoma sofrem deleção, α^0 ($-/-\alpha\alpha$). Esta é referida como uma mutação *cis*, contrária à *trans*, que ocorre quando a deleção está presente em cromossomas opostos. A α^0 -talassemia pode ser, também, descrita através da extensão de uma deleção que remova ambos os genes α . (44)

A doença da Hb H ($-/-\alpha$), provocada pela deleção de três genes α , é o resultado da combinação da α^0 com a α^+ , deixando apenas um gene α funcional. A redução da síntese das cadeias de α -globina resulta na formação de tetrâmeros pelas cadeias β livres (β_4). Estes tetrâmeros possuem uma capacidade de transporte do oxigénio reduzida, devido à sua fraca afinidade para como o oxigénio. É uma hemoglobina instável que, quando oxidada, vai precipitar dentro do eritrócito, resultando numa diminuição da vida dos glóbulos vermelhos. Em algumas Hb H não-delecionais, a variante da hemoglobina é ainda menos estável, podendo provocar disfunção da membrana celular e hemólise. Nos casos de deleções extremas que afectem os quatro genes da α -globina (*Hidrops fetalis* ou Hb de Bart), não ocorre síntese de cadeias α e, por essa razão, as Hb F, A e A₂, não são sintetizadas. (44)

Tabela 5: Classificação das α -talassemias com origem em mutações delecionais. (Adaptado de (6))

Tipo de deleção	Fenótipo
Deleção de um gene α (total ou parcial)	α^+ -talassemia
Deleção de ambos os genes α (total ou parcial), sem deleção do HS-40	α^0 -talassemia
Deleção de ambos os genes α e do HS-40	α^0 -talassemia
Extensa perda do cromossoma 16p13.3 (1-2Mb) incluindo ambos os genes α e o HS-40	α^0 -talassemia
Deleção de um gene $\alpha 1$ e 18-20kb a jusante do gene $\alpha 1$	α^0 -talassemia
Deleção do elemento HS-40 sem deleção dos genes α	α^0 -talassemia ou α^+ -talassemia muito severa

Apesar da maioria das mutações ser de origem deletional, foram descritas mais de 40 formas de α -talassemia não-deletional. Geralmente, o portador heterozigótico não apresenta anemia hemolítica, não sendo, por isso, de grande interesse clínico. Os outros estados apresentam variantes da hemoglobina instáveis que, originam anemias hemolíticas ou possuem efeitos adversos na afinidade para o oxigênio. É esta interação entre as diferentes mutações deletionais e não-deletionais, que origina variedade de fenótipos. Geralmente, a presença de mutações não-deletionais tem um efeito mais severo na expressão do gene, resultando numa expressão menos compensatória dos restantes genes α e em hemoglobinas mais instáveis. (44)

Tabela 6: Classificação das α -talassemias com origem em mutações não-deletionais (Adaptado de (6))

Tipo de Mutação	Fenótipo
Mutação no sítio de <i>splice</i> do RNA do gene α_1 ou α_2	α^+ -talassemia
Mutações no sinal de poliadenilação	α^+ - α^0 -talassemia severa ou α^+
Tradução do RNA comprometida devido a mutação no códon de iniciação ou na sequência consenso	α^+ -talassemia, α^+ - α^0 ou, quando a mutação está associada a α -talassemia deletional, α^0 -talassemia
Tradução do RNA comprometida derivada de uma mutação <i>nonsense</i> ou <i>frameshift</i>	α^+ ou α^0 -talassemia
Tradução do RNA comprometida derivada de uma mutação no códon de terminação, conduzindo ao alongamento do mRNA da cadeia globínica α	α^+ -talassemia
Produção de cadeias α altamente instáveis, resultantes de uma mutação pontual ou uma pequena deleção	α^+ -talassemia
Ausência do factor de transactivação codificado pelo gene ATRX	α^+ -talassemia

III.1.2.1 Tipos de α -talassemia

- α^0 -talassemia (Portador Silencioso) e α^+ -talassemia

Os estados de portador silencioso de α -talassemia resultam, frequentemente, de estados heterozigóticos derivados de mutações deletionais ($-\alpha/\alpha\alpha$). Nos recém-nascidos pode ser observada uma ligeira subida (1-2%) da Hb de Bart, tetrâmero de cadeias

globínicas (γ_4), presente quando se verifica um excesso de cadeias γ relativamente às cadeias α e que desaparece ao fim do primeiro ano de vida, não sendo substituído por Hb H. Nos adultos, a deleção do gene pode ser completamente silenciosa ou estar associada a uma microcitose e hipocromia moderadas, com níveis normais de Hb A₂ e F. (13,43)

Nos estados homozigóticos estas condições são caracterizadas por uma ligeira anemia microcítica e hipocrômica, com níveis de VGM e HGC significativamente reduzidos e Hb de Bart elevada ao nascimento. (43)

Indivíduos que possuam dois genes α residuais e funcionais, quer seja em *cis* ($--/\alpha\alpha$) ou em *trans* ($-\alpha/-\alpha$), apresentam traço α -talassémico, caracterizado por um aumento moderado (5-6%) da Hb de Bart nos recém-nascidos e por anemia microcítica e hipocrômica moderada e sem alterações significativas na percentagem de Hb F e Hb A₂ no adulto. (13)

- Doença da Hemoglobina H

A doença da Hb H resulta da presença de apenas um gene de α -globina residual funcional ($--/-\alpha$). Consequentemente, observa-se um excesso de cadeias de β -globina, que formam tetrâmeros β_4 (Hb H). Dada a instabilidade da Hb H, ocorre a formação de precipitados no interior dos eritrócitos que são prematuramente destruídos no fígado, resultando numa hemólise moderada a severa. (13)

As características predominantes da doença da Hb H são anemia (2.6-13.3 g/dL), com quantidades variáveis de Hb H (0,8-40%), ocasionalmente acompanhadas por Hb de Bart no sangue periférico. Os doentes apresentam frequentemente esplenomegalia, que pode ser severa. Podem, ainda, apresentar diversos graus de icterícia e as crianças podem desenvolver problemas de crescimento. Outras complicações incluem infecções, úlceras nas pernas, pedras na vesícula, deficiência em ácido fólico e episódios hemolíticos agudos em resposta a drogas e infecções. Os pacientes mais velhos apresentam um certo grau de sobrecarga de ferro.

A severidade do quadro clínico está claramente relacionada com a base molecular da doença. Pacientes com variantes não-delecionais da doença são mais severamente afectados do que aqueles com os tipos mais frequentes de mutações delecionais. (45)

- Síndrome *Hidrops fetalis* ou Hb de Bart

A Hb de Bart representa a α -talassemia com condição clínica mais severa. Está normalmente associada a ausência funcional dos quatro genes da α -globina ($--/--$). Como já foi referido, nestes casos o feto é incapaz de sintetizar Hb F ou Hb A. O sangue fetal contém, maioritariamente, altos níveis de Hb de Bart e pequenas quantidades de Hb Portland. (13)

Apesar da maioria dos casos resultar da herança de nenhum gene α por parte dos pais, em alguns casos pode resultar da herança de uma mutação não-deleccional severa por parte de um progenitor e de nenhum gene α da parte do outro progenitor. (45)

O quadro clínico é caracterizado por uma anemia severa (Hb, 3-8 g/dL), hepatoesplomegalia acentuada, *hydrops fetalis* e falha cardíaca, tendo também sido reportados casos de outras anomalias congénitas ao nível dos sistemas cardíaco, esquelético e urogenital. Em condições normais, esta condição não é compatível com a vida, o que leva a que os fetos afectados morram *in útero* ou pouco tempo após o nascimento. (13, 45)

Tabela 7: Tipos de α -talassemia e sua descrição clínica (Adaptado de (13))

Fenótipo	Descrição Clínica
Portador Silencioso	Clínica e hematologicamente normal.
Traço Talassémico	Microcitose, hipocromia e anemia moderada
Doença da Hb H	Anemia microcítica e hipocrômica moderada a severa, anemia hemolítica, icterícia moderada, hepatoesplenomegalia moderada.
Hb de Bart ou Síndrome <i>hidrops fetalis</i>	Anemia severa, edema generalizado, ascite, hepatoesplenomegalia marcada, malformações esqueléticas e cardiovasculares, morte <i>in útero</i> .

III.2. Hemoglobinopatias Estruturais

A maioria das anomalias estruturais tem origem numa mutação única no código genético, resultando na substituição de um aminoácido. No caso das hemoglobinopatias estruturais, este processo é mais complexo. Existem alguns tipos de hemoglobinas anormais que resultam de duas substituições de aminoácidos e outros que são o produto de mutações que removem um codão stop, levando à produção de moléculas de hemoglobina excepcionalmente longas e instáveis.

A maioria das variantes de hemoglobina não produz doença. Os portadores destas variantes silenciosas não apresentam, geralmente, anomalias clínicas ou hematológicas relacionadas com a presença da variante. No entanto, variantes de hemoglobinas silenciosas podem provocar alterações na contagem eritrocitárias, ou seja, hemoglobinas que apresentem uma grande afinidade para o oxigénio, originam um aumento do número de eritrócitos, com consequente elevação dos níveis de hemoglobina.

Infelizmente, algumas variantes da hemoglobina podem apresentar efeitos significativos tanto a nível clínico como hematológico.

Tabela 8: Variantes estruturais com significado clínico mais comuns. (Adaptado (42))

Hemoglobina	Origem Geográfica Associada	Substituição do aminoácido	% presente nos estados heterpzigóticos
S	África	$\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$	40%
C	África	$\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$	40%
E	Ásia	$\beta 26 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$	30%
G _{Filadélfia}	África	$\alpha 68 \text{ Asn} \rightarrow \text{Lys}$	20, 30, 40%
D _{Los Angeles}	Europa/Índia	$\beta 121 \text{ Glu} \rightarrow \text{Gln}$	40%
O _{Arab}	África	$\beta 121 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$	40%
Lepore	Mediterrânica	$\delta(1-87) \beta(116-146)$	10-15%

- Hemoglobina S ou Doença Falciforme

A hemoglobina S (Hb S) é uma variante da hemoglobina do adulto (Hb A) que resulta da substituição pontual de um ácido glutâmico por uma valina na sexta posição da cadeia da β -globina ($\text{GAG} \rightarrow \text{GTG}$: Glu6Val). (2, 22)

Esta hemoglobina mutante ($\alpha_2\beta^{\text{S}}_2$), possui propriedades físico-químicas bastante distintas das observadas na hemoglobina normal, devido à perda de duas cargas eléctricas por molécula de hemoglobina (derivada da perda do ácido glutâmico). Apresenta, ainda, uma estabilidade e solubilidade distintas, demonstrando uma forte tendência para a formação de polímeros e, originando uma série de alterações na estrutura do eritrócito que incluem a deformação e rigidez da membrana celular, contribuindo para fenómenos de vaso-oclusão. Este fenómeno é responsável por várias alterações estruturais e funcionais em diversos órgãos e sistemas do doente. (22)

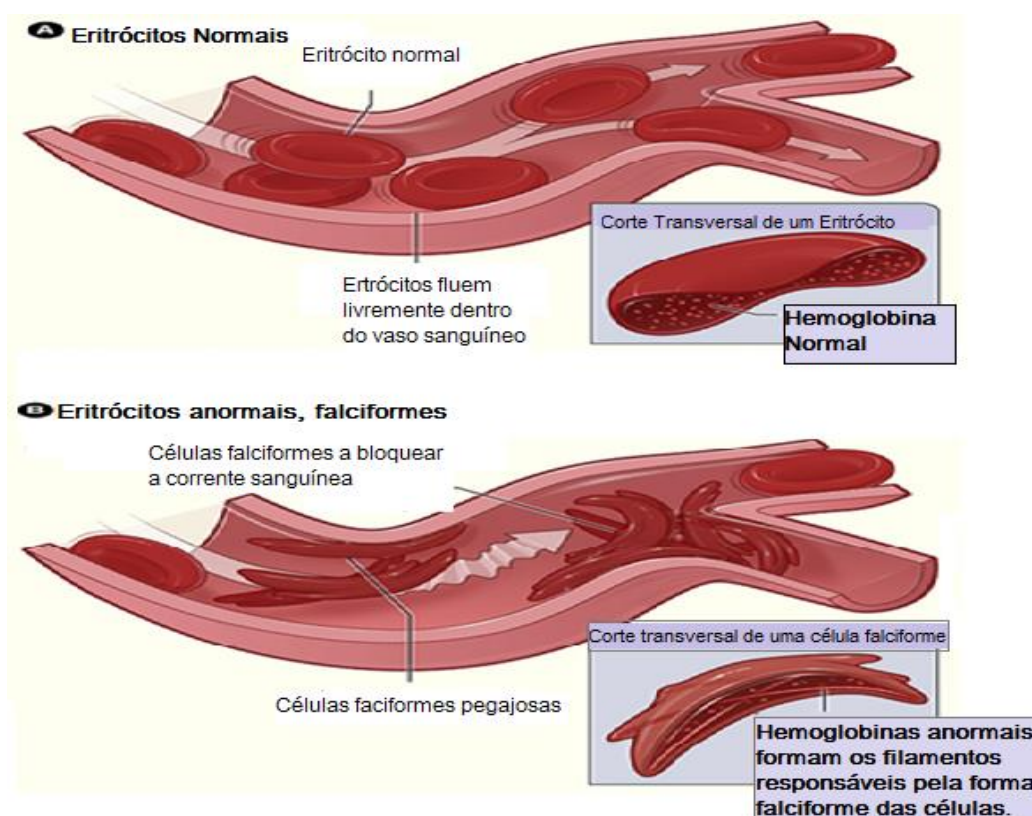


Figura 15: Eritrócitos normais, células falciformes e oclusão vascular. (Adaptado de (39))

- Hemoglobina S homozigótica (drepanocitose ou Hb SS)

A anemia falciforme é o nome dado ao estado homozigótico da Hb S. Ao contrário dos portadores (Hb AS), o historial dos doentes com anemia falciforme é caracterizado por vários episódios dolorosos, geralmente vaso-oclusivos, com ou sem efeito mielodepressivo. Os sinais e sintomas englobam anemias crónicas com períodos de agravamento, dores nas extremidades e nas juntas das mãos e pés, dores abdominais, necrose asséptica da medula óssea, etc. (33)

Geralmente, os recém-nascidos com anemia falciforme, não apresentam problemas derivados desta condição, devido à alta concentração de Hb F presente nos eritrócitos nos dois primeiros meses de vida. Com a substituição gradual da Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) pela Hb S ($\alpha_2\beta_2^S$), proveniente da redução genética da síntese das γ -globinas e indução genética da síntese das β^S -globinas, a doença começa a manifestar-se mas só a partir do quarto mês de vida. (33)

Laboratorialmente, verificam-se casos de anemia grave, com hemoglobina variável (5-9 g/dL), associados a uma queda acentuada do hematócrito e das contagens

eritrocitárias, apresentando normocitose e normocromia, apesar da anisocitose e poiquilocitose resultantes da presença das células falciformes. (33)

Na electroforese das hemoglobinas, observam-se concentrações variáveis de Hb S e Hb F com valores entre os 2-10%. A Hb A está sempre ausente em pacientes não transfundidos. (33)

- Hemoglobina S Heterozigótica (Hb AS)

O portador assintomático é representado laboratorialmente pela associação das hemoglobinas A e S ou Hb AS. Nestes heterozigotos, a concentração de Hb S é sempre inferior à concentração de Hb A, o que faz com que estes doentes não apresentem sintomatologia nem alterações hematológicas. (33)

A sua natureza heterozigótica deve-se à herança do gene da β^S -globina por parte de um dos progenitores, juntamente com um gene β^A proveniente do outro. Estes portadores são normalmente identificados em estudos populacionais, familiares ou pré-natais. (33)

A interacção entre a Hb AS e a α -talassemia com um ou dois genes afectados, pode ser identificada através da presença de Hb H com concentrações entre 0,5-5%, além das hemoglobinas A₂, S e A, havendo nestes casos, diminuição da Hb S. Nestes casos, os valores hematológicos encontram-se dentro da normalidade e, por vezes, é normal haver casos de anisocitose e poiquilocitose no esfregaço de sangue periférico. (33)

A interacção da Hb AS com a Hb H é extremamente rara, apresentando concentrações de Hb H variável entre os 10-20% e concentrações de Hb S entre os 15-20%. A Hb A₂ encontra-se visivelmente reduzida. Nestes casos a anemia pode ir de moderada a grave, com alterações intensas da morfologia eritrocitária. (33)

O gene da Hb S encontra-se distribuído nas áreas da África subsariana, subcontinente Indiano, Médio Oriente, onde a frequência de portadores ronda os 50% ou mais. (5)



Figura 16: Distribuição global das Hemoglobinopatias E e S (Adaptado de (5))

- Hemoglobinas Instáveis

Uma minoria significativa das hemoglobinas mutantes apresenta substituições que alteram a solubilidade da molécula nos eritrócitos. Os precipitados intra-eritrocitários, derivados das hemoglobinas instáveis, podem ser detectados através da observação de corpos de Heinz. Estas inclusões intracelulares reduzem o tempo de vida dos eritrócitos e desencadeiam um processo hemolítico, de severidade variável, denominado anemia hemolítica congénita. A electroforese das hemoglobinas apresenta um padrão de bandas anormal.(2)

- Hemoglobinas M

Estas hemoglobinas são caracterizadas pela presença de ferro do heme no estado férrico (Fe^{3+}) em vez de estar no estado ferroso (Fe^{2+}).

Entre os aminoácidos altamente conservados das subunidades da hemoglobina, existem duas histidinas, uma na posição da hélice F8, que se liga ao ferro do heme e outra na hélice E7, presente na cavidade onde o oxigénio e outros ligandos se unem ao heme (ver Figura 4). A substituição, através de uma mutação, de qualquer uma destas histidinas da cavidade do heme por uma tirosina, nas subunidades das globinas α , β ou γ , resulta numa alteração no ambiente electrónico do ferro do heme, uma vez que a tirosina, ao possuir uma carga negativa e ao estar unida com o ferro, estabiliza a sua forma oxidada e impede a união reversível ao oxigénio. Assim, a cadeia afectada pela mutação perde a sua capacidade funcional e a hemoglobina comporta-se como metahemoglobina, daí o nome hemoglobina M. Estas hemoglobinas podem resultar das seguintes mutações: $\alpha 58 \text{ His} \rightarrow \text{Tyr}$, $\alpha 87 \text{ His} \rightarrow \text{Tyr}$, $\beta 63 \text{ His} \rightarrow \text{Tyr}$, $\beta 92 \text{ His} \rightarrow \text{Tyr}$, $\gamma 63 \text{ His} \rightarrow \text{Tyr}$ e $\gamma 92 \text{ His} \rightarrow \text{Tyr}$.

Existe ainda uma mutação, $\beta 67 \text{ Val} \rightarrow \text{Glu}$ que resulta em características bioquímicas e quadros clínicos semelhantes aos das restantes mutações. (2)

São herdadas com carácter autossómico dominante e, consequentemente, os heterozigotos são portadores de cianose, sem outros transtornos. A cianose é irreversível e não desaparece com a administração de substâncias redutoras (ácido ascórbico ou azul de metileno). Os níveis de hemoglobina, nestes doentes, encontram-se dentro dos parâmetros normais.

Prevenção e Controlo de Hemoglobinopatias

Desordens nas cadeias de globina são comuns e constituem um problema de saúde pública. O diagnóstico pode ser pedido:

- 1- Para confirmar um diagnóstico presuntivo, como drepanocitose ou β -talassemia *major*;
- 2- Para explicar uma anomalia hematológica, como a anemia ou microcitose;
- 3- Para identificar a anomalia numa fase pré-sintomática, como no rastreio neonatal;
- 4- Para identificar fetos com alto risco de hemoglobinopatias e orientar os pais;
- 5- Para permitir aconselhamento genético em futuros pais;
- 6- Para identificar a presença de hemoglobina S; (46)

Métodos Laboratoriais para Identificação de anomalias na Síntese da Hemoglobina

O diagnóstico dos distúrbios da hemoglobina requer, normalmente, uma combinação de métodos de diagnóstico. Regra geral, os testes laboratoriais de rotina apenas indicam as características bioquímicas da hemoglobina, não permitindo a identificação precisa do distúrbio. Clinicamente, a sua identificação presuntiva e adequada requer a combinação de pelo menos duas técnicas sendo posteriormente feita uma comparação dos resultados obtidos com o quadro clínico do doente, a sua etnia e com os resultados do hemograma e esfregaço sanguíneo. (6)

- Amostra

Nos procedimentos laboratoriais para a detecção de hemoglobinopatias são normalmente usadas amostras de sangue venoso, colhidas em tubos com anticoagulante (EDTA).

Em recém-nascidos, além de amostras de sangue venoso, podem ser utilizadas amostras de sangue do cordão umbilical ou de sangue capilar obtidas por punção

subcutânea, neste caso as amostras são colhidas para tubos capilares com heparina. Os testes também podem ser feitos através de amostras recolhidas para o Teste de Guthrie.

As amostras devem ser conservadas no frigorífico, a 4°C, e processadas o mais rapidamente possível, nunca excedendo uma semana desde a colheita da amostra. (6)

A hemoglobina é melhor conservada em sangue total, uma vez que os eritrócitos possuem metahemoglobina redutase, que converte a metahemoglobina em oxihemoglobina. A glucose do plasma e a albumina estabilizam os eritrócitos e asseguram a manutenção da actividade da enzima. Com um armazenamento prolongado da amostra, mais metahemoglobina é gerada e as hemoglobinas mutantes que possam existir na amostra podem ser selectivamente perdidas. (6, 24)

- Hemograma

Sempre que existe suspeita de uma hemoglobinopatia, é recomendada a realização de hemograma completo, com observação do esfregaço de sangue periférico. É um dos primeiros testes, cujos resultados podem levantar fortes suspeitas de hemoglobinopatias.

A contagem dos eritrócitos permite distinguir entre uma anemia ferropénica e uma talassemia. Indivíduos com talassemias ou anemia ferropénica apresentam uma menor concentração de hemoglobina, quando comparados com indivíduos saudáveis, apresentando ainda microcitose e hipocromia. Já a eritrocitose é característica dos portadores β -talassémicos e resulta de um mecanismo compensatório devido a um HGM cronicamente diminuído. Este mecanismo de compensação é mantido através da manutenção dos níveis de ácido fólico, o que permite restaurar os níveis de hemoglobina num portador de talassemia com microcitose acentuada, para níveis próximos do normal. Por outro lado, esta compensação pode ser menos evidente em casos onde existe um défice de ácido fólico, essencial para a divisão celular e consequentemente, para a eritropoiese. (1, 47)

O RDW permite a medição do grau de anisocitose. As anemias microcíticas decorrentes de anemia ferropénica são caracterizadas por uma elevação do RDW, contrariamente às talassemias que tendem a produzir eritrócitos microcíticos mas sem grandes variações de tamanho. Este facto pode variar consoante a síndrome talassémica, no entanto, observa-se um notável aumento do RDW em casos de Hb H e $\delta\beta$ -talassemia. (1)

- **Teste de Falciformação**

A presença de hemoglobina S pode ser demonstrada através do teste de falciformação que, como o nome indica, consiste na da falciformação dos eritrócitos quando o sangue é desoxigenado. Coloca-se uma gota de sangue numa lâmina e cobre-se a amostra com uma lamela. Seguidamente sela-se a lâmina com cera ou outro material isolador de modo a que a actividade metabólica dos leucócitos conduza à desoxigenação da amostra. Passado algum tempo, a lâmina é observada ao microscópio. Uma frequente modificação a este método consiste na adição, à gota de sangue, de uma gota de metabissulfito de sódio a 2%, um agente redutor que vai diminuir os níveis de oxigénio. (6)

- **Teste de Solubilidade da Hb S**

O teste de solubilidade da hemoglobina S deve ser realizado sempre que é detectada uma variante da hemoglobina suspeita de ser da hemoglobina S. Este teste tem como princípio o maior grau de solubilidade da Hb S em relação à Hb A, numa solução altamente fosfatada. (24) O teste pode ser realizado através da obtenção de um *kit* que inclua os reagentes necessários.

Este teste não apresenta uma boa sensibilidade para a detecção de Hb S no período neonatal, uma vez que neste período ainda não se deu a transição da Hb F para a hemoglobina do adulto. (48)

- **Detecção de Inclusões da Hemoglobina H**

Este teste deve ser realizado sempre que haja uma suspeita de doença da hemoglobina H. O princípio deste teste é a precipitação da hemoglobina H quando exposta a um oxidante leve como o azul de cresil brilhante. A presença de inclusões de hemoglobina H difere consoante o doente tenha feito (ou não) uma esplenectomia. Caso não tenha sido submetido a esta intervenção cirúrgica, o doente apresenta pequenas inclusões azuis, semelhantes a bolas de golfe, distribuídas ao longo de célula. Os doentes submetidos a esplenectomia apresentam corpos de Heinz e as referidas inclusões azuis surgem durante a incubação com corantes supravitais. (6)

- Detecção de corpos de Heinz

Este teste faz-se através da incubação da amostra com violeta de metilo ou azul de cresil brilhante e é relevante sempre que se suspeita de uma hemoglobina instável. Se não for possível a visualização dos corpos de Heinz numa amostra fresca, deve-se proceder à incubação da mesma, a 37°C, durante 24h. (6)

- Electroforese das Hemoglobinas

A electroforese das hemoglobinas é um das técnicas mais utilizadas na detecção inicial, caracterização e quantificação de variantes das hemoglobinas, apesar de presentemente estar a ser substituída por outros métodos como a Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). (24)

As proteínas são compostas por aminoácidos que possuem cadeias laterais ionizantes. Como são anfotéricas, ou seja, possuem cadeias com carga negativa e positiva, a sua carga total irá depender do pH da solução e do pK dos seus aminoácidos. Como são moléculas carregadas, quando aplicadas num campo eléctrico, irão migrar a uma velocidade e direcção dependentes do sinal e da magnitude da sua carga total. (24)

A um pH de 8.6 todas as hemoglobinas humanas apresentam carga total negativa e, conseqüentemente, migram em direcção ao polo positivo ou ânodo presente no sistema electroforético. Mutações que não alterem a sua carga podem ser “silenciadas”, não sendo assim detectadas através da electroforese. No entanto, a sua interacção com a matriz (acetato de celulose ou agar) pode também influenciar a velocidade de migração. (24)

Antes de se proceder à electroforese das hemoglobinas, deve haver uma preparação da amostra de sangue total de forma a obter um hemolisado.

As electroforeses das hemoglobinas podem ser realizadas em papel de filtro, membranas de acetato de celulose, gel de amido (agar de amido), agar de citrato ou gel de agarose. No entanto, as matrizes mais utilizadas são o acetato de celulose a um pH de 8.4-8.6 e o agar de citrato a um pH de 6.0. (6)

A um pH de 8.4-8.6, a membrana de acetato de celulose permite a separação e a identificação provisória das hemoglobinas H, A, F, S/G/D, A₂/C/E/O-árabe, entre outras variantes da hemoglobina menos conhecidas. Aquelas que possuem maior mobilidade electroforética do que a hemoglobina A, a um pH de 8,6, são denominadas hemoglobinas rápidas. A Hb de Bart e as hemoglobinas H e I são bons exemplos deste fenómeno. A Hb

C é a hemoglobina comum mais lenta. A electroforese das hemoglobinas é um método pouco fiável no que respeita à quantificação de variantes de hemoglobina de menor concentração (ex. Hb A₂) ou de maior rapidez (Hb H, Hb de Bart). (47)

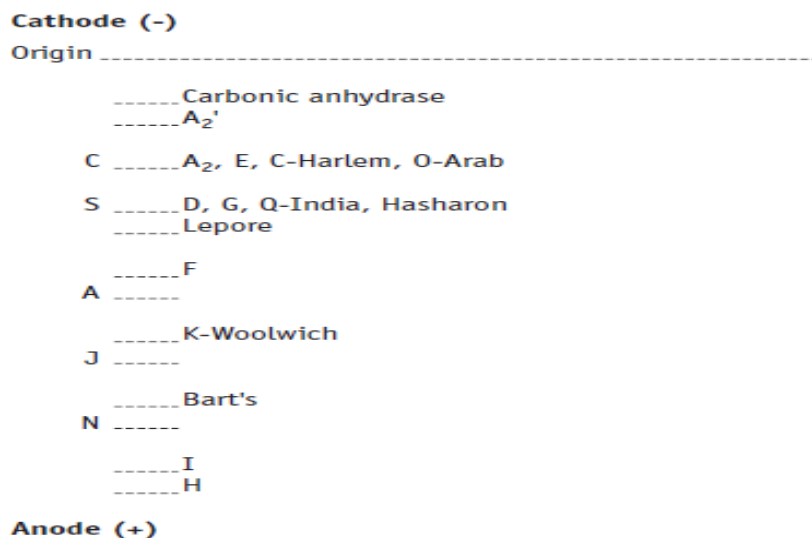


Figura 17: Representação das mobilidades relativas de algumas hemoglobinas anormais em acetato de celulose, a pH alcalino. (Adaptado de (35))

A diferenciação entre hemoglobinas que migram para posições semelhantes no gel (banda única) pode ser obtida através de técnicas como a electroforese em pH ácido (pH 6,0-6,2), em agar de citrato. Nesta técnica, a separação das hemoglobinas não depende apenas da sua carga eléctrica, também é influenciada pela interacção da amostra com os vários componentes do agar. O agar possui agarose e agarpectina, um polissacarídeo sulfatado. A agarose polimeriza e é imóvel, mas a agarpectina consegue formar complexos com alguns dos aminoácidos da hemoglobina. Estes complexos migram em direcção ao ânodo, enquanto a restante hemoglobina é transportada em direcção ao cátodo através da corrente endosmótica. Esta técnica diferencia a Hb S da D/G, mas não faz a distinção entre os vários tipos de Hb D/G. No entanto, permite a distinção entre a Hb C e a E, C-Harlem e O-Arab e ajuda a distinguir as três últimas umas das outras. (6)

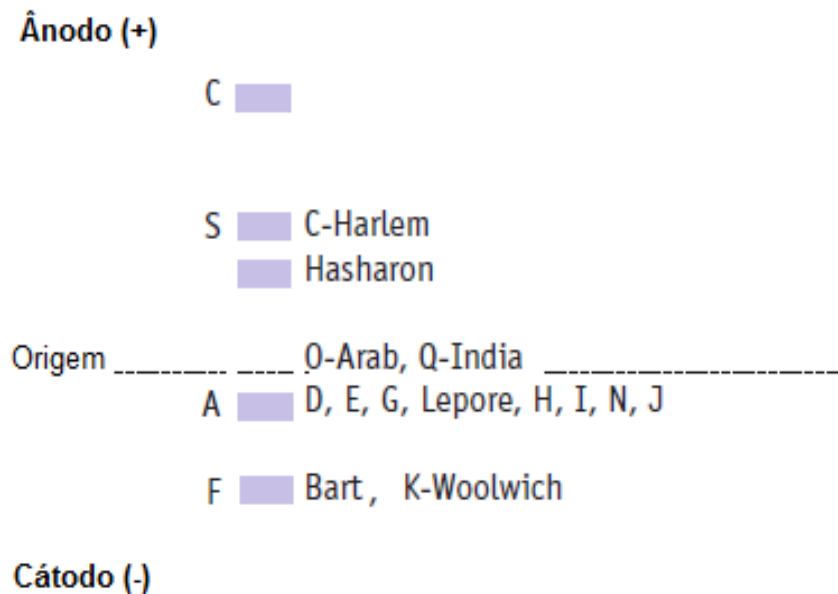


Figura 18: Representação das mobilidades relativas de algumas hemoglobinas anormais em agar de citrato (Adaptado de (35))

- **Focagem Isoelétrica**

A focagem isoeletrica permite uma maior resolução do que a obtida através das técnicas electroforéticas. Se uma molécula possui um ou mais grupos ionizáveis, pelo menos um deles tem um pK na zona do pH ácido e outro na zona do pH básico, isto faz com que haja um valor de pH em que a carga total seja zero. As proteínas e aminoácidos possuem um pH no qual a sua carga total é igual a zero (ponto isoeletrico). Para separar as proteínas com base no seu ponto isoeletrico, deve ser criado um gradiente de pH estável. Este gradiente pode ser obtido através da adição de anfólitos cujos pontos isoeletricos cubram a extensão de pontos isoeletricos das proteínas que queremos separar numa matriz de suporte. (24) Quando o hemolisado é aplicado na matriz de suporte (que pode ser acetato de celulose ou gel de poliacrilamida) inserida num campo fortemente electrificado, as moléculas de hemoglobina migram através da matriz até alcançarem o ponto no qual o pH corresponde ao ponto isoeletrico da hemoglobina, formando bandas que podem ser quantificadas através de densitometria. (6)

Esta técnica permite uma boa separação das hemoglobinas F e A e de variantes de hemoglobina com um alto significado clínico como a Hb S, C, D-Punjab, E e O-Arab). (46)

A focagem isoeletrica tem como vantagem uma melhor resolução quando comparada com a electroforese e permite a separação de mais variantes da hemoglobina. No entanto, a Hb E não pode ser distinguida da Hb C-Harlem e da Hb O-Arab. O mesmo acontece com as outras hemoglobinas como a Hb G-Philadelphia, Hb G-Coushatta e Hb Lepore, o que faz com que a interpretação dos resultados seja mais difícil não permitindo um diagnóstico conclusivo, devendo por isso recorrer-se a métodos de segunda linha. (46)

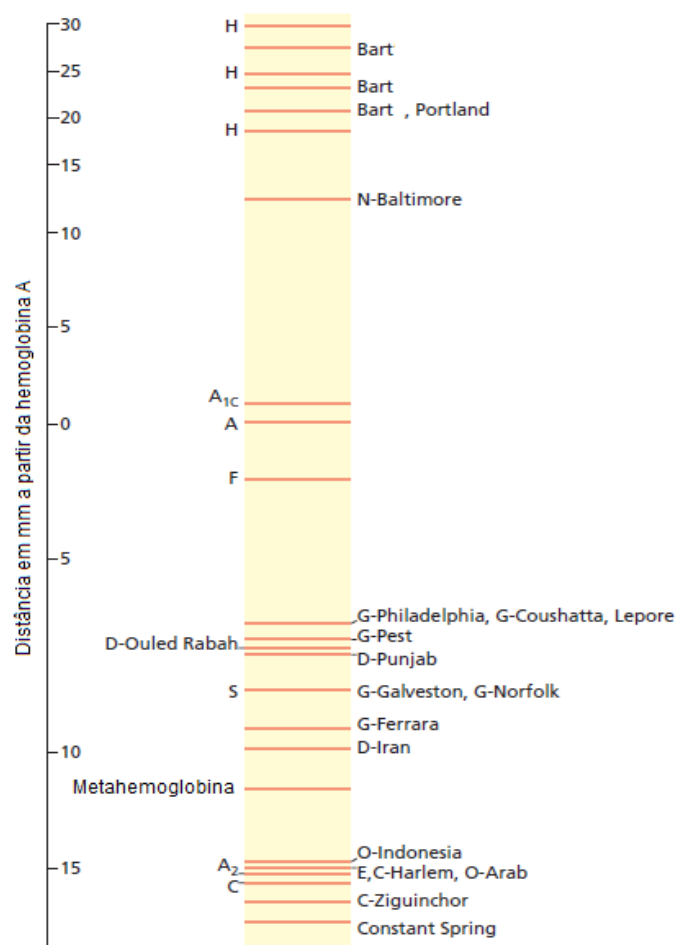


Figura 19: Diagrama com as mobilidades das várias hemoglobinas numa matriz de focagem isoeletrica. (Adaptado de (6))

- Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

A HPLC é um tipo de cromatografia em coluna geralmente usada em bioquímica e análises de separação e identificação de compostos activos. Enquanto as outras técnicas dependiam da ionização dos aminoácidos das moléculas de hemoglobina e da sua migração num campo eléctrico, na HPLC as interacções iónicas e hidrofóbicas da amostra com a matriz de suporte são a base da separação. (6)

Através desta técnica, é possível a separação de uma mistura de moléculas (como hemoglobina normal e as suas variantes) nos seus componentes através da sua carga positiva e consequente absorção para uma fase estacionária carregada negativamente, presente numa coluna de cromatografia, seguida pela sua eluição por meio de uma fase móvel. A fase móvel é um líquido com uma concentração crescente de catiões que segue através da coluna. Os catiões da fase móvel competem com as proteínas absorvidas pelos sítios de ligação aniónicos. Assim, as moléculas de hemoglobina, positivamente carregadas, são eluídas da coluna para a fase líquida a um ritmo dependente da sua afinidade para com a fase estacionária. Ao serem separadas desta forma, podem ser detectadas opticamente no eluído, provisoriamente identificadas através do seu tempo de retenção e quantificadas através da utilização de *software* específico que mede o pico correspondente no perfil de eluição. Quanto mais positivamente carregadas estiverem as hemoglobinas, maior será o tempo de retenção. Esta tecnologia pode ser aplicada na identificação de variantes de hemoglobina pois para cada variante, assim como para a hemoglobina normal, existem tempos de retenção característicos. (6)

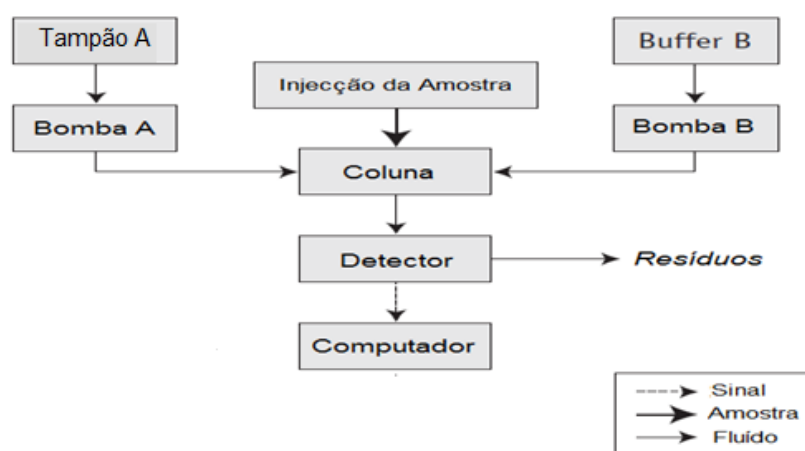


Figura 20: Diagrama representativo de um HPLC (Adaptado de (35))

A hemoglobina pode ser separada como um tetrâmero intacto ou, sob condições desnaturantes, em cadeias de globina individuais. (24) A HPLC geralmente separa as hemoglobinas A, A₂, F, S, C, D^{Punjab} e G^{Philadelphia} umas das outras. No entanto, as hemoglobinas E e Lepore podem co-eluir com a Hb A₂ (tal como outras hemoglobinas podem co-eluir com as hemoglobinas A, S e F). O tempo de retenção da Hb S e seus derivados pode ser o mesmo que os da Hb A₀ e A₂. É por esta razão e pelo facto de existirem mais de 1000 variantes identificadas, que a HPLC não pode identificar, definitivamente, nenhuma hemoglobina. Tal como acontece com os outros métodos já descritos, este funciona igualmente como exame complementar e o diagnóstico deve ser sempre feito com base nos dados obtidos através dos diferentes testes diagnóstico de modo a completar as suas falhas e melhor contribuir para um diagnóstico acertado. (35)

No entanto, a HPLC apresenta as seguintes vantagens quando comparada com a electroforese das hemoglobinas:

1. Os analisadores são automáticos o que requer menos tempo de manipulação pelos técnicos;
2. Permite o processamento de um grande número de amostras.
3. São necessários pequenos volumes de amostra. 5µL são suficientes para uma análise.
4. Permite a quantificação de hemoglobinas normais e variantes em cada amostra.
5. Podem ser realizadas várias identificações provisórias de um largo número de variantes da hemoglobina.
6. Variantes da cadeia δ são facilmente detectadas. (24)

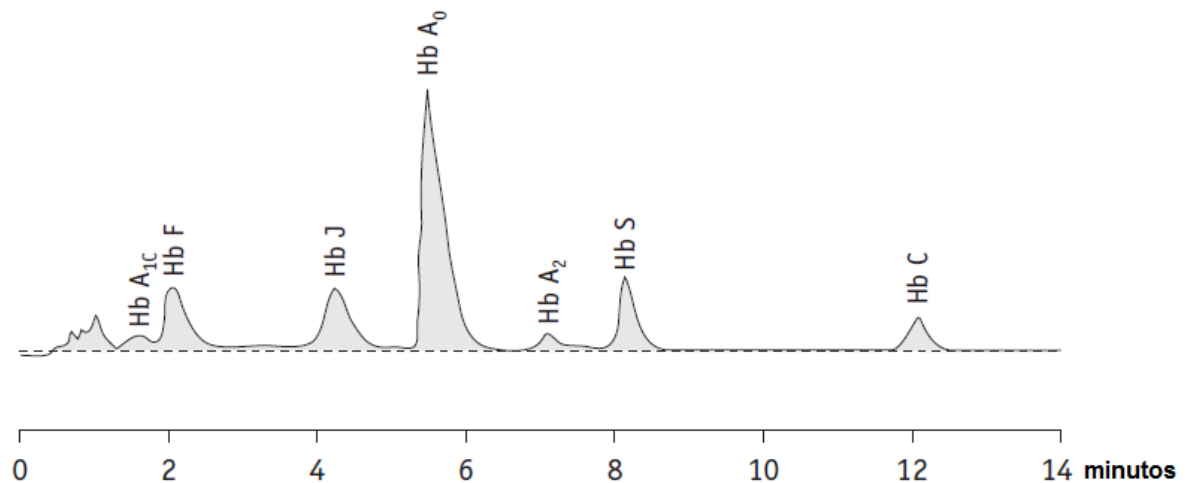


Figura 21: Separação de hemoglobinas através do método de HPLC (Adaptado de (35))

- **Diagnóstico Molecular (DNA)**

Após o diagnóstico presuntivo das hemoglobinopatias e síndromes talassémicas, recorre-se à análise de DNA com o objectivo de:

- Confirmar o diagnóstico de α^0 -talassemia (normalmente em casos de aconselhamento genético);
- Confirmação da presença de hemoglobina D^{Punjab}, devido à sua grande importância clínica;
- Diagnóstico pré-natal de alterações graves na síntese das hemoglobinas em fetos (essencial no diagnóstico durante o primeiro trimestre). (6)

Várias técnicas baseadas na reação de polimerização em cadeia (PCR) podem ser utilizadas na detecção de mutações já conhecidas nos genes das globinas, o que inclui análises *Dot-blot*, análise de *Dot-blot Reversa*, sistema ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*), DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), MC-PCR (*Mutagenically Separated Polymerase Chain Reaction*) e análise com endonucleases de restrição. (24, 47)

Tabela 9: Técnicas de análise de DNA para o diagnóstico de hemoglobinopatias
(Adaptado de (6))

Diagnóstico	Teste
α^0-talassemia	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Análise por <i>Southern blot</i> ✓ gap-PCR ✓ PCR, ARMS ✓ PCR em tempo real ✓ <i>Dot blot</i> reversa ✓ ELISA (detecção de cadeias embrionárias δ) ✓ Sequenciação
β-talassemia:	
Mutações conhecidas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ PCR com <i>primers</i> alelo específicos ✓ gap-PCR
Mutações desconhecidas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ DGGE ✓ RFLP ✓ Sequenciação de DNA
Hb Lepore	✓ gap-PCR; Sequenciação
$\delta\beta$-talassemia	✓ gap-PCR; Sequenciação
PHHF	✓ gap-PCR; Sequenciação
Hb S	✓ PCR; Digestão com <i>Ddel</i>
Hb C	✓ PCR com <i>primers</i> alelo específicos
Hb E	✓ PCR com <i>primers</i> alelo específicos ou enzimas de restrição
Hb D^{Punjab}	✓ PCR; Digestão com <i>EcoRI</i>
Hb O-Arabe	✓ PCR; Digestão com <i>EcoRI</i>

Rastreio e Prevenção de Formas Graves de Hemoglobinopatias

Os rastreios de hemoglobinopatias têm como principal objectivo, a identificação de portadores destas patologias de modo a averiguar se um casal está em risco de ter uma criança afectada com uma forma grave de hemoglobinopatia e providenciar informação sobre o que fazer para evitar tal eventualidade. Idealmente, os rastreios devem ser feitos antes da gravidez. (26)

Conhecer a frequência e heterogeneidade das hemoglobinopatias numa população alvo é um pré-requisito essencial para planear a melhor estratégia de identificação de portadores assim como os métodos laboratoriais necessários. (26)

Existem duas classes de rastreio: os rastreios em massa fornecidos à população em geral antes e após a puberdade; e os rastreios de alvos específicos, que são restritos a um determinado grupo populacional, como casais que pretendem constituir família, antes da concepção ou durante as primeiras semanas de gravidez. (26)

- Grupos de Risco

Factores que classificam um individuo como pertencente a um grupo de risco para uma determinada hemoglobinopatia:

- ✓ História familiar de anemias, talassemias ou variantes de hemoglobina;
- ✓ Anemia e/ou valores de VGM < 80 fL ou HGM < 27 pg;
- ✓ Níveis de hemoglobina acima do normal para a idade, sexo e estado de gravidez sem patologia associada;
- ✓ Origem étnica ou geográfica de zonas com alta frequência de hemoglobinopatias como: Sul da Europa, Médio Oriente, África, China, sudoeste Asiático, subcontinente Indiano, América do Sul, Austrália, etc;
- ✓ Mulheres com problemas de fertilidade ou que recorram a inseminação assistida;
- ✓ Parceiros de portadores de hemoglobinopatias identificados;

- Tipos de Rastreio

- i. Rastreio pré-concepcional

O rastreio pré-concepcional das hemoglobinopatias é recomendado para todos os grupos de risco. É um teste importante pois permite quantificar o risco que o casal tem de vir a gerar uma criança com patologia severa associada às hemoglobinopatias. É um rastreio relativamente fácil de implementar na rotina clínica e os seus resultados devem ser postos ao dispor de outras especialidades médicas. Os indivíduos devem ser sempre informados dos resultados dos testes de diagnóstico quer os resultados sejam positivos ou negativos. No caso de se identificar uma anomalia, deve-se proceder ao teste do parceiro. (46)

O rastreio pré-concepcional deve ser aplicado a mulheres com problemas de fertilidade e às que recorrem à inseminação assistida. Se a mulher for diagnosticada como heterozigota para uma hemoglobinopatia, o parceiro ou dador de esperma devem também ser testados e a mulher deve ser encaminhada para o aconselhamento genético. Este processo também se aplica a dadoras de óvulos que devem, igualmente, ser testadas para as hemoglobinopatias. (46)

- ii. Rastreio pré-natal

O procedimento utilizado no rastreio pré-natal difere consoante estamos numa zona com uma alta frequência para as hemoglobinopatias ou numa zona de baixa frequência. (46)

Nas zonas de alta frequência, deve ser preenchido um inquérito de origem familiar e inicia-se o padrão de diagnóstico normal com hemograma completo, electroforese das hemoglobinas e/ou HPLC. Estes testes devem ter resultados antes das 11 semanas de gestação e caso seja necessária a análise ao parceiro, esta deve estar finalizada nas primeiras 12 semanas de gestação. (46)

Nas áreas de baixa prevalência, a realização do teste resulta da avaliação individual do risco, aquando da determinação da origem familiar de ambos os membros do casal. Esta avaliação não dispensa a análise do hemograma completo

Este rastreio é recomendado a todas as grávidas, mesmo que já se encontrem numa fase mais avançada da gravidez. Os resultados podem ser relevantes na presente gestação, assim como em futuras gestações. (46)

iii. Rastreio neonatal

O sangue do cordão umbilical ou uma amostra recolhida através de punção subcutânea devem ser testados em todos os bebés em risco para hemoglobinopatias como a drepanocitose ou a β -talassemia *major* (quando um dos pais apresenta um gene para a Hb S, C, D^{Punjab}, E, O^{Arab} Lepore ou $\beta/\delta\beta$ - talassemia). (35)

Em zonas de risco, este rastreio deve ser aplicado sempre que possível.

Bebés que tenham sido diagnosticados, provisoriamente, com hemoglobinas SS, SC, SD^{Punjab}, SO^{Arab} ou S β -talassemia, devem repetir os testes no espaço de 6-8 semanas após o nascimento. (35)

iv. Rastreio pré-operatório

Antes de qualquer anestesia é importante a realização de testes para o diagnóstico de drepanocitose em todos os doentes provenientes de zonas de alta frequência de Hb S. A Hb S, tem influência nas técnicas de anestesia, uma vez que os baixos níveis de O₂ podem induzir a formação de células falciformes. Em situações de emergência deve ser realizado um hemograma completo e um teste de solubilidade. (46)

• Em Portugal

Como já foi referido, a distribuição das hemoglobinopatias em Portugal apresenta um padrão heterogéneo, com zonas de maior prevalência no Centro e Sul do país. Os portadores heterozigotos, apesar de assintomáticos, quando se cruzam entre si, têm uma probabilidade de 25%, em cada gravidez, de originar filhos homozigotos, que apresentam os quadros clínicos mais severos das doenças e, geralmente, com morbilidade e mortalidade elevadas. Neste contexto, é recomendada a detecção e informação precoce (pré-concepcional), de adultos portadores, devendo ser feita a selecção, identificação e aconselhamento genético dos casais de risco, assim como a oferta de diagnóstico pré-natal quando necessário. (29)

Em 1986, foi criado o Programa Nacional de Controlo de Hemoglobinopatias (PNCH), em cooperação com a Organização Mundial de Saúde e coordenado pelo Instituto Ricardo Jorge, tendo como objectivos a prevenção, diagnóstico e tratamento das formas graves das hemoglobinopatias. O PNCH tem como população alvo os habitantes provenientes dos distritos de Beja, Évora, Faro, Leiria, Lisboa, Santarém e Setúbal e os imigrantes provenientes de regiões com alta prevalência desta patologia: países africanos, subcontinente Indiano, Timor e Brasil. (29)

Com base nestas considerações, a Direcção Geral de Saúde recomenda a pesquisa de hemoglobinopatias a todas as mulheres em idade reprodutiva, em particular, nas consultas de planeamento familiar, pré-concepcional ou, com carácter de urgência, na primeira consulta da gravidez. (29)

A detecção de portadores de hemoglobinopatias é feita com base no hemograma e no estudo das hemoglobinas, composto por uma electroforese de hemoglobinas e a quantificação de HbA₂ e F, preferencialmente por técnicas de HPLC. Quando há suspeita de α -talassemia, a confirmação só pode ser feita por técnicas de biologia molecular. (29)

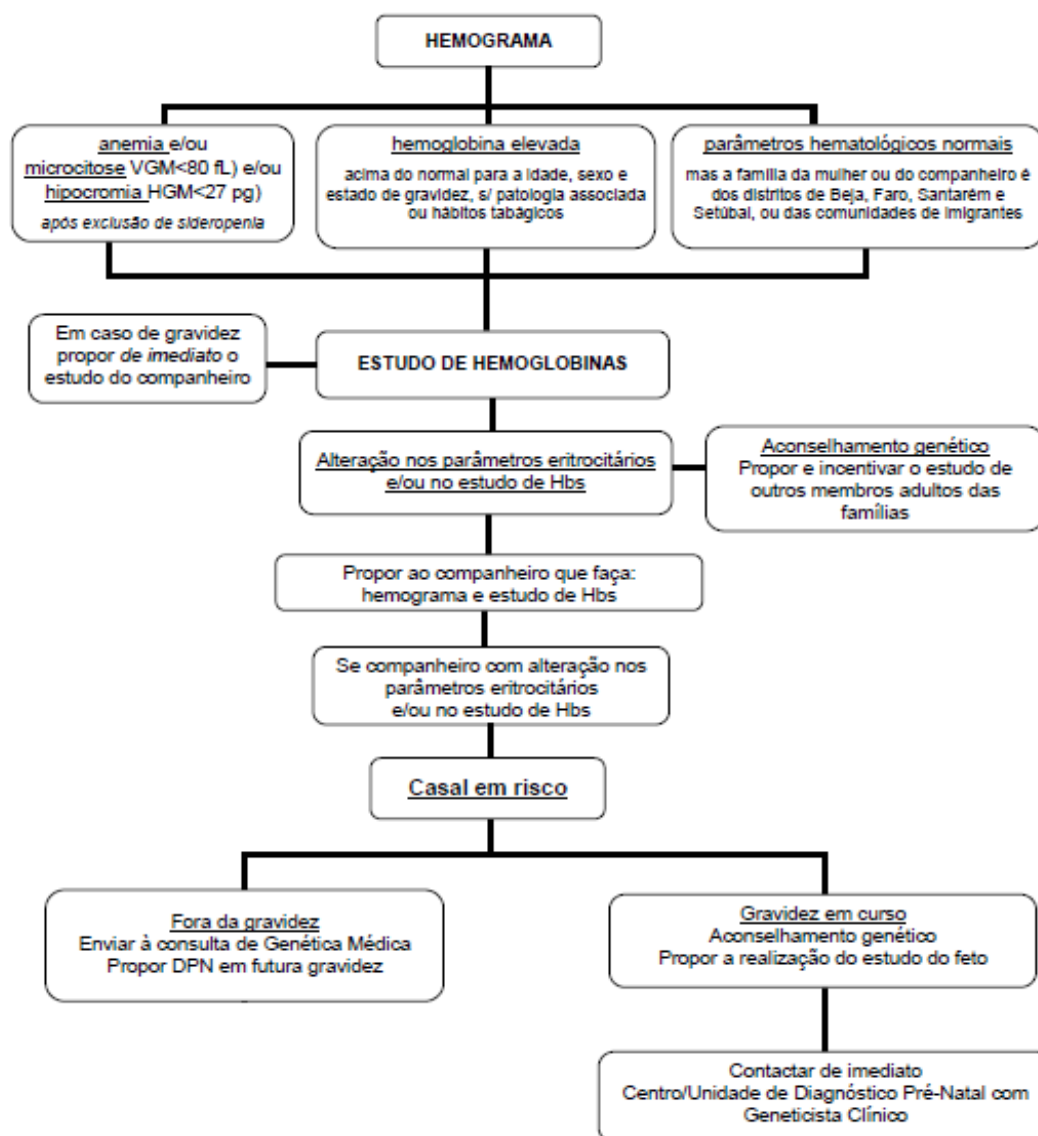


Figura 22: Diagrama representativo do protocolo de prevenção das formas graves de hemoglobinopatias em grupos de risco, aprovado pela Direcção Geral de Saúde. (Adaptado de (29))

V.III. Aconselhamento Genético

O aconselhamento genético tem como principal objectivo prestar assistência psicológica e informativa, de modo a permitir a indivíduos ou famílias a tomada de decisões consistentes e psicologicamente equilibradas no que respeita à sua reprodução. Também pode exercer uma função preventiva, dependente de opções livres e conscientes dos casais que apresentam risco de gerar filhos com hemoglobinopatias severas. O

objectivo é consciencializar os indivíduos, sem os privar do seu direito à decisão reprodutiva.

Existem três tipos de aconselhamento genético:

i. Consultoria Genética

Destina-se a indivíduos (geralmente um casal) que apresentam um risco real, já estabelecido por vínculo reprodutivo estável, de gerar filhos com quadros de hemoglobinopatia severa ou relevante. Esses casais, geralmente constituídos por dois portadores (heterozigotos), são classificados como “casais de risco”. Geralmente estes casais são encaminhados para receber aconselhamento genético, devendo os indivíduos ser devidamente informados no que respeita aos objectivos da consulta e o carácter opcional do aconselhamento genético. (50)

ii. Orientação Genética

O doente está ciente da sua alteração genética e do seu risco mas, não há a necessidade de tomar uma decisão reprodutiva naquele momento. Geralmente este indivíduo apresenta um potencial risco de gerar um filho com hemoglobinopatia severa, mas esse risco está dependente do genótipo de um futuro parceiro reprodutivo. (50)

iii. Informação Genética

Processo de divulgação da hemoglobinopatia para um público que pode não estar envolvido com a doença. Tal processo informativo pode consistir na divulgação através de cartazes, aulas, palestras, divulgação nos meios de comunicação social, etc., e é fundamental para o aconselhamento genético solicitado espontaneamente. A informação genética pode dar origem a uma orientação genética e, consequentemente, a um aconselhamento genético propriamente dito. (50)

1. Objectivo

Na presente monografia foi incluído um estudo retrospectivo, de 1 ano (2012-2013), sobre as hemoglobinopatias no Hospital José Joaquim Fernandes de Beja.

O objectivo geral deste trabalho foi caracterizar uma série de casos de hemoglobinopatias, numa população residente numa área com alta frequência para estas doenças e comparar os resultados obtidos com o que foi descrito nesta monografia, de modo a consolidar os conhecimentos teóricos com a realidade hospitalar.

2. Amostra

A informação utilizada para a realização deste estudo retrospectivo foi obtida através da consulta dos registos dos casos clínicos do Hospital José Joaquim Fernandes em Beja. O registo/arquivo destes casos clínicos só começou a ser feito em Novembro de 2012, de modo que os dados apresentados nesta monografia são referentes ao período compreendido entre Novembro de 2012 e Outubro de 2013, data em que concluí o estágio, tendo sido seleccionados um total de 36 casos.

Para cada um dos casos, foram registadas uma série de variantes, nomeadamente, sexo, idade, valores do hemograma e padrões de migração das electroforeses das hemoglobinas. (Anexo I).

3. Resultados

Dos 36 casos que constituíam inicialmente a amostra, só foram considerados para esta casuística 25 registos, devido à exclusão de casos que, após o teste de confirmação, apresentavam padrões normais de migração das hemoglobinas A e A₂, com valores de doseamento da Hb A₂ dentro dos valores de referência.

A amostra passou, assim, a ser constituída por 20 indivíduos do sexo feminino (80%) e 5 do sexo masculino (20%).

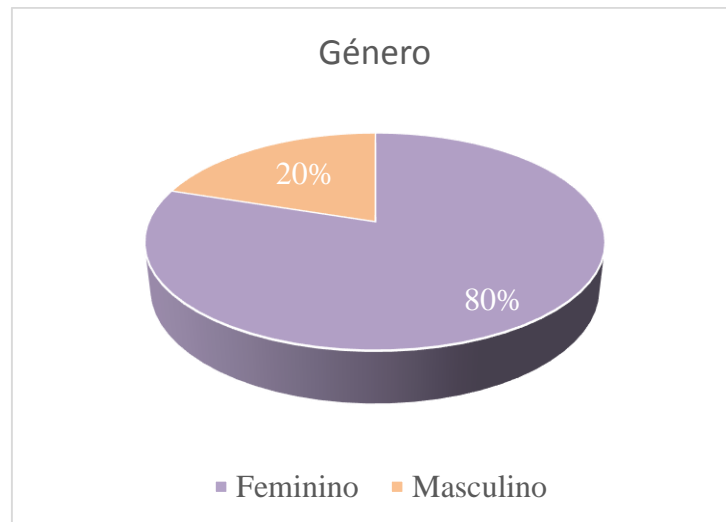


Figura 23: Distribuição da amostra por gênero.

Na totalidade da amostra (n=25), verificou-se um intervalo etário bastante alargado com idades compreendidas entre os 12 e os 82 anos. A média das idades foi de 47 anos com mediana de 51 e um desvio padrão de 11,49.

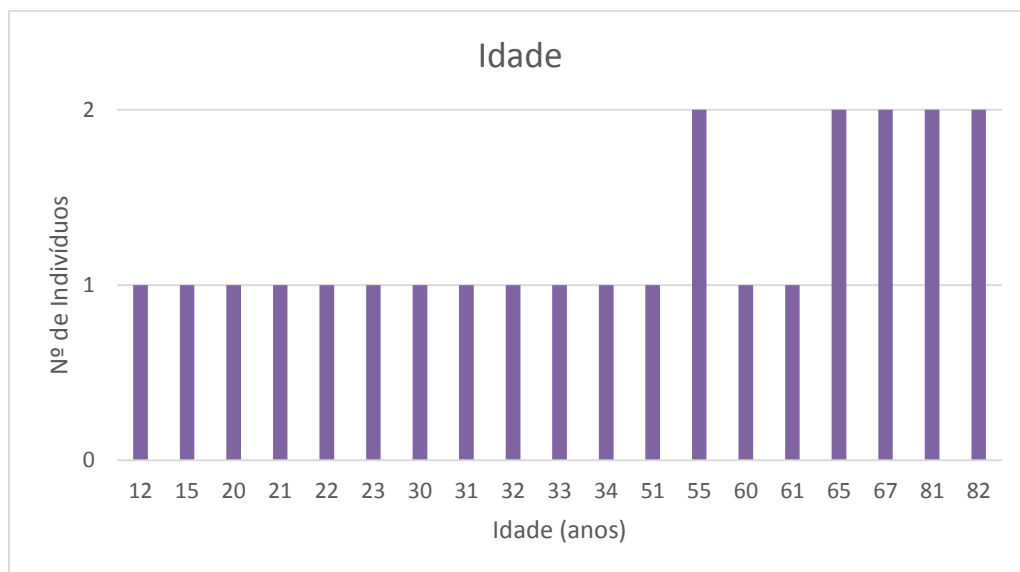


Figura 24: Distribuição etária dos indivíduos em estudo.

Dos 25 casos de hemoglobinopatias identificadas, 18 eram compatíveis com o fenótipo de portador de β -talassemia (72%), 5 apresentavam um fenótipo de portador de Hb S (20%), 1 de portador de Hb D (4%) e ainda um outro caso com indícios da presença de uma variante da hemoglobina, que migra na zona da Hb J (4%)

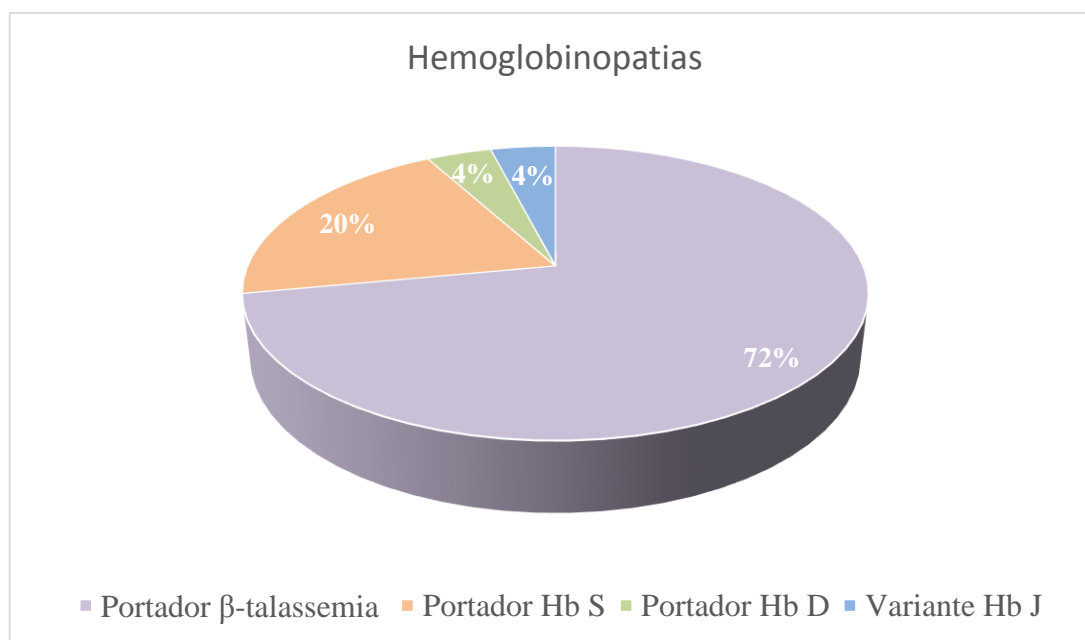


Figura 25: Distribuição das hemoglobinopatias na amostra

4. Discussão

Durante o meu estágio no Hospital José Joaquim Fernandes em Beja, tive oportunidade de contactar directamente com o diagnóstico presuntivo das hemoglobinopatias, no âmbito de uma Unidade Local de Saúde. Como já foi referido anteriormente, o distrito de Beja é uma das regiões com maior prevalência de hemoglobinopatias, pois abrange a área correspondente ao rio Guadiana que foi, durante anos, um dos principais focos de malária no nosso país.

Os métodos de diagnósticos utilizados no hospital consistiam no hemograma completo e na electroforese das hemoglobinas. Sempre que as electroforeses revelavam perfis de hemoglobina alterados, as amostras eram encaminhadas para o INSA, através do PNCH, onde eram realizados novos hemogramas, técnicas de focagem isoeléctrica para a análise de hemoglobinas anormais e, quando necessário, HPLC de troca catiónica para doseamento de hemoglobinas, HPLC de fase reversa para estudo das cadeias de globina e o teste de solubilidade da Hb S.

A maioria dos pedidos para realização de electroforeses das hemoglobinas, provinha do serviço de Obstetrícia, sendo por vezes incluído no diagnóstico pré-natal do primeiro trimestre de gestação. Isto explica elevado número de amostras pertencentes a indivíduos do sexo feminino, em comparação com o número de amostras do sexo masculino.

No entanto, este facto não explica a elevada heterogeneidade de idades nesta amostra. A média de idades situa-se nos 47 anos, o que é uma média relativamente mais alta do que se esperava. Dada a origem da maioria dos pedidos para electroforese das hemoglobinas, inicialmente esperava-se que a grande percentagem de testes positivos correspondesse a mulheres grávidas ou em idade fértil. Esta casuística apresenta uma percentagem de 52% dos indivíduos com idade superior a 50 anos, sendo considerados diagnósticos tardios.

Foram identificados portadores de β -talassemia, onde, a maioria dos casos, revelava perfis de migração normais, com alterações significativas no hemograma e doseamentos da Hb A₂ elevados, apesar de homogéneos. Foram ainda detectados portadores de outras variantes da hemoglobina que migram na região S, o que resultou na identificação de portadores de Hb S e Hb D.

A amostra do portador de Hb D revelava a presença do grupo heme da hemoglobina, de cadeias α da hemoglobina, de cadeias β normais (Hb A), de cadeias δ (Hb A₂) e de uma cadeia β variante, com um perfil de eluição e tempo de retenção relativo de acordo com a presença de cadeias β D (Hb D numa percentagem elevada).

Ainda dentro das variantes da hemoglobina, foi identificado um possível portador de uma hemoglobina J. Durante a focagem isoeléctrica, observou-se uma fracção mais anódica do que a Hb A que migrava na região da Hb J. Após a realização do doseamento da Hb A₂, verificou-se que os resultados estavam dentro dos valores de referência. Foi então feita uma separação e quantificação das hemoglobinas através da técnica de HPLC de fase reversa. Este perfil cromatográfico revelou a presença de uma variante de hemoglobina que elui entre a Hb A e a Hb F. O posterior doseamento da Hb F obteve um resultado dentro do normal e sugeriu-se o estudo molecular para identificação desta variante da hemoglobina.

Na maioria dos casos, foi sugerida a realização de rastreios aos familiares mais próximos e que poderiam apresentar um risco de 50% de serem portadores da hemoglobinopatia identificada. Nos casos de portadores da Hb S, foi igualmente proposta a realização do rastreio para as hemoglobinopatias aos cônjuges.

As hemoglobinopatias representam um grave problema de saúde pública a nível mundial. Os portadores heterozigóticos de formas severas destas doenças são frequentemente assintomáticos e, na maioria das vezes, apenas detectados através de rastreios.

As migrações maciças dos últimos anos levaram a que muitos portadores saudáveis destas patologias se estabelecessem e reproduzissem em áreas não endémicas, alterando o padrão epidemiológico local e trazendo uma necessidade urgente de tratamentos e prevenções primárias aos países acolhedores.

Em Portugal, a implementação de programas de rastreio para a detecção de portadores de hemoglobinopatias e aconselhamento genético, na tentativa de prevenir e controlar o número de novos casos, com quadros clínicos mais severos e melhorar as hipóteses de sobrevivência dos indivíduos afectados, tem apresentados resultados positivos.

Como a detecção de portadores está dependente da disponibilidade dos sistemas de saúde e da informação adequada da população, os profissionais de saúde devem igualmente ser sensibilizados para este problema de modo a intervir atempadamente, a realizar diagnósticos mais acertados e a prescrever a terapêutica necessária sem descuidar o acompanhamento do doente ao longo do tempo.

A população deve ter acesso a mais informação sobre esta temática de modo a desenvolver um conhecimento dos riscos e consequências que estas patologias acarretam.

As consultas de aconselhamento genético, dada a sua importância a nível do acompanhamento psicológico e informativo dos doentes, deveriam estar inseridas nos hospitais distritais das zonas de maior frequência para as hemoglobinopatias, evitando, assim, grandes deslocações por parte do doente para ter acesso ao apoio e aconselhamento necessários.

Dados os níveis de migrações dos últimos anos, são necessários novos estudos, mais precisos, sobre a frequência e distribuição actual destes distúrbios, que possibilitem um melhor planeamento, ao nível da medicina familiar e o alargamento dos rastreios a nível nacional e não apenas a nível regional. A identificação de portadores deveria, assim, ser incluída nos exames de rastreio do primeiro trimestre de gravidez, de modo a identificar casais de risco a nível nacional e a tempo de realizarem uma escolha informada, a situação o justifique.

À Professora Doutora Isabel Bettencourt Moreira da Silva, minha orientadora, pela disponibilidade, compreensão e paciência que demonstrou desde logo e pelo seu inestimável contributo para este trabalho. Agradeço-lhe imenso por tudo.

À Doutora Rosa Fula Bento, minha orientadora de estágio e a todos os técnicos e restante pessoal do Hospital José Joaquim Fernandes em Beja, que me receberam e aturaram durante seis meses. Aprendi muito com todos vocês. Obrigada pela paciência e por toda a ajuda.

À minha família, pela motivação e apoio que sempre me deram, em especial aos meus pais e ao meu irmão, que abdicaram de muitas coisas para que pudesse terminar este trabalho.

Aos meus amigos, pela motivação e apoio e por estarem sempre presentes quando mais precisei.

1. Traeger-Synodinos J, et al. EMQN best practice guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet* 2014 Jul 23.
2. Forget BG, Bunn HF. Classification of the disorders of hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3.
3. OMS. Drepanocitosis y otras hemoglobinopatías [Online]. 2011 Jan [obtido em 2014 Mai]; Disponível: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs308/es/>
4. Turgeon ML. Clinical hematology theory and procedures. 5ª ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
5. Weatherall D *et al.* Chapter 34: inherited disorders of hemoglobin. Em Jamison BJ, editor. Disease control priorities in developing countries. 2ª ed. Washington (DC): World Bank; 2006.
6. Bain BJ. Hemoglobinopathy diagnosis. 2ªed. Blackwell Publishing; 2006.
7. Brandan N, Aguirre MV, Giménez CE. Hemoglobina cátedra de bioquímica. facultad de medicina UNNE; 2008
8. Loukopoulos DL. Hemoglobinopathies. *Encyclopedia of Life Sciences*; 2002
9. Anatomy & Physiology [Internet] [Obtido em 2014 Nov]; Disponível: <http://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46707.html>
10. Peñuela OA. Hemoglobina una molécula modelo para el investigador. *Colomb Med* 2005 Jul-Set; 36:215-225
11. Scribd. Hemoglobina e mioglobina [Internet] 2010 Ago 18.[Obtido em 2015 Jan] Disponível: <http://pt.scribd.com/doc/36069180/Hemoglobina-e-Mioglobina>
12. Higgs DR. The molecular basis of α -thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3.
13. Galanello R, Cao A. Alpha-thalassemia. *Genet Med* 2011 Fev;13:83-88.
14. Phin H, Voon J, Vadolas J. Controlling α -globin a review of α -globin expression and its impact on β -thalassemia. *Haematologica* 2008;93:1868-1876.
15. Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT. *Williams Hematology* 8ª ed. The McGraw-Hill Companies;2010.
16. Thein SL. Genetic insights into the clinical diversity of β -thalassaemia. *Br J Haematol* 2004;124:264-274.
17. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med* 2010 Fev;12:61-76

18. Hemoglobin Synthesis [Internet] 2014 Abr 14. [Obtido em 2014 Out] Disponível: <http://sickle.bwh.harvard.edu/hbsynthesis.html>
19. Thein SL. The molecular basis of β -thalassemia. Cold Spring Har Perspect Med 2013;3
20. Sargento L. Síntese da hemoglobina durante o desenvolvimento fetal em hemoglobina. Actas Bioquímica 2007;8:27-33.
21. Torres FR. Hemoglobinas humanas hipótese malária ou efeito materno? Rev Bras Hematol Hemoter 2005;27(1):53-60.
22. Neto GC et al. Aspectos moleculares da anemia falciforme. J Bras Patolog Med Lab 2003;36(1):51-56.
23. King MW. The medical biochemistry page: [Internet] [Obtido em 2014 Set] Disponível : <http://themedicalbiochemistrypage.org/hemoglobin-myoglobin.php>
24. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. Disorders of hemoglobin genetics pathophysiology and clinical management. Cambridge, RU: Cambridge University Press: 2009
25. Miranda A, Costa S, Seuanes F, Gaspar G, Picanço I, Seixas T. Estudo bioquímico de portadores de hemoglobinopatias. Boletim Epidemiológico do INSA 2013.
26. Angastiniotis M. Prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders, volume 1. Thalassaemia International Federation, Nicosia, Cyprus 2013.
27. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bol WHO, 2001;79
28. World Health Organization. Global distribution of haemoglobin disorders in terms of births of affected infants per 1000 births [Internet] [Obtido em 2015 Jan] Disponível: <http://www.who.int/genomics/public/Maphaemoglobin.pdf>
29. Direção-Geral de Saúde. Prevenção de formas graves de hemoglobinopatia. Circular Normativa nº8/DSMIA , 2004 Set 7.
30. Martins MC, Olim G, Melo J, Magalhães HA, Rodrigues MO. Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance and control. J Med Genet 1993;30:235-239.
31. Capellini MD, Cohen A, Porter J, Taher A, Viprakasit V. Guidelines for the management of transfusion dependent thalassemia. 3ª ed. Thalassaemia International Federation 2014

32. Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA et al. Wintrobe's Clinical Hematology. 12^a ed. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009
33. Naoum PC, Naoum FA. Hemoglobinopatias [Internet] [Obtido em 2014] Disponível em: <http://www.hemoglobinopatias.com.br/>
34. Grosso M, Sessa R, Puzone S, Storino MR, Izzo P. Molecular basis of thalassemia. [Internet] 2012 [obtido em 2014 Maio] Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/anemia/molecular-basis-of-thalassemia>
35. Bain BJ, Bate I, Laffan MA, Lewis SM. Dacie and Lewis practical haematology. 11^a ed. Elsevier Limited; 2011
36. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. Orphanet J Rare Dis 2010;5:11
37. Bernard G, Bunn F, Bunn HF. Classification of the disorders of hemoglobin. Cold Spring Harb Perspect Med 2013;3:a011684
38. Thein SL. The molecular basis of β -thalassemia. Cold Spring Harb Perspect Med 2013;3
39. NHLBI [Internet] 2012, Jul 3 [Obtido a 2014 Mai] Disponível em: <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/thalassemia/causes>
40. Malcorra JJ. Hemoglobinopatías y Talassemias. BSCP Can Ped 2001;25(2):265-277
41. Rappaport VJ, Velazquez M, Williams K. Hemoglobinopathies in pregnancy. Obstet Gynecol Clin North Am. 2004 June;31(2):287-317
42. Keren DF. Clinical evaluation of hemoglobinopathies: structural changes. Warde Med Lab 2003;14(3)
43. Vichinsky EP. Clinical manifestations of α -thalassemia. Cold Spring Harb Perspect Med 2013 Mar 29;3
44. Singer ST. Variable clinical phenotypes of α -thalassemia syndromes. The Scientific World Journal 2008;9:615-625
45. Hartevelde CL, Higgs DR. α -thalassaemia. Orphanet Journal of Rare Diseases 2010;5(13)
46. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, et al. Significant haemoglobinopathies: Guidelines for screening and diagnosis. Blackwell Publishing Ltd, editors. Br J Haematol 2010;149:35-49
47. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. Clinical Chemistry 2000;46(8): 1284-1290

48. Bandeira FMGC, Leal MC, Souza RR, Furtado VC, Gomes YM. Diagnóstico da hemoglobina S: análise comparativa do teste de solubilidade com a electroforese em pH alcalino e ácido no período neonatal. Rev Bras Saúde Matern Infant 2003 Jul-Set;3(3):265-270
49. Vítor JMB. Protocolos de genética humana [Internet] [Obtido em 2015 Jan] Disponível: http://www.ff.ul.pt/~jvitor/My_site/GH_LCS_files/Protocolo1.pdf
50. Ramalho AS, Magna LA. Aconselhamento genético do paciente com doença falciforme. Rev bras hematol hemoter 2007;29(3):229-232

Anexo I

Tabela 1.1: Variantes relativas aos casos clínicos de hemoglobinopatias seleccionados da casuística do Hospital José Joaquim Fernandes, em Beja, durante o período de Novembro de 2012 a Outubro de 2013.

Amostra	Sexo	Idade	Hb (g/dL)	VGM (fL)	HGM (pg)	GV(10 ¹² /L)	Hb A	Hb A2	Hb F	Hb S	Observações	Fenótipo
1	Feminino	20	13,4	88,4	30,2	4,45	↓↓	N		↑↑		Portador de Hb S
2	Feminino	31	13,6	91,3	29,6	4,58	↓↓	N	N	↑↑	Hb J	Variante de Hb
3	Feminino	61	10,1	57,5	17,5	5,75	↓	↑				Portador β-talassemia
4	Feminino	51	12,1	62,7	20,5	5,91	↓	↑				Portador β-talassemia
5	Feminino	33	11,6	85,1	30,6	3,8	↓↓	N		↑↑		Portador de Hb S
6	Masculino	65	10,3	63,7	19,1	5,39	↓	↑	↑			Portador β-talassemia
7	Feminino	23	10,9	71,8	21,6	5,06	↓	↑	↑			Portador β-talassemia
8	Feminino	30					↓	↑	↑			Portador β-talassemia
9	Feminino	32	10,1	74,2	21,4	4,7	↓	↑	N			Portador β-talassemia
10	Feminino	30	11,6	65,5	20,9	5,56	↓	↑				Portador β-talassemia
11	Masculino	65	6,9	81,9	25,2	2,73	↓	↑	N			Portador β-talassemia
12	Masculino	60	11,5	71,6	21,3	5,41	↓	↑				Portador β-talassemia
13	Feminino	67	11,4	66,9	21,4	5,35	↓	↑	↑			Portador β-talassemia
14	Feminino	22	9,5	66	20,5	4,64	↓	↑				Portador β-talassemia
15	Masculino	12	11,3	59,5	18,3	6,18	↓	↑				Portador β-talassemia
16	Feminino	81	9,2	56,5	16,4	5,6	↓	↑				Portador β-talassemia
17	Masculino	67	14,4	97,2	31,5	4,57	↓↓	N		↑↑		Portador de Hb S
18	Feminino	82	8,5	58,8	18	4,72	N	↑				Portador β-talassemia
19	Feminino	34	12,9	85	28,2	4,57	↓↓	N		↑↑		Portador de Hb S
20	Feminino	21	9,6	72,7	22,8	4,21	↓	↑	↑	↑		Portador β-talassemia
21	Feminino	55					↓↓	N		↑↑		Portador de Hb S
22	Feminino	55	13,7	79	29,8	4,6	↓↓	N		↑↑	Hb D	Portador Hb D

23	Feminino	82	8,7	84,3	26,9	3,22			N		Portador β -talassemia
24	Feminino	81	10	64,4	20	5					Portador β -talassemia
25	Feminino	15	9,5	64	18,9	5,03	N				Portador β -talassemia

